NEDERLANDSCHE PHYTOPATHOLOGISCHE (PLANTENZIEKTEN-KUNDIGE) VEREENIGING.

TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN

ONDER REDACTIE VAN

M. DE KONING

IR N. VAN POETEREN EN PROF. DR. W. K. J. ROEPKE

Vier en dertigste Jaargang - 11e en 12e Aflevering - December 1928

ONDERZOEK OVER DE DOOR PHOMA APIICOLA KLEBAHN VEROORZAAKTE SCHURFTZIEKTE VAN DE KNOLSELDERIJ EN OVER SYNERGETISCHE VORMEN EN LOCALE RASSEN VAN DEZE ZWAM.

DOOR

J. A. A. M. H. GOOSSENS.

INHOUD.

Blz.

Inleiding 273

PATHOLOGISCH DEEL
(het gedrag der zwamvormen tegenover de waardplant).

HOOFDSTUK I. De door *Phoma apiicola* veroorzaakte ziekte 277
1. De naam en de economische beteekenis der ziekte 277
2. Literatuur over het optreden en de oorzaak der ziekte en over haar voorkomen op andere plantensoorten 278
3. Ziektesymptomen 281

HOOFDSTUK II. Isolatie van *Phoma apiicola* KLEBAHN 283
1. Isolatie- en kweekmethoden 283
2. Een micro- en een macro-vorm van *Phoma apiicola* 285
3. Locale rassen van *Phoma apiicola* 289

HOOFDSTUK III. Infectieproeven 290
1. Met mycelium 290
2. Met pycnosporen 292
3. Infectie van planten in verschillende ontwikkelingsstadia in besmetten grond 294

HOOFDSTUK IV. De vatbaarheid van verschillende knolselderij-variëteiten 299

Blz.

HOOFDSTUK V. *Phoma apiicola* KLEBAHN en *Phyllosticta apii* HALSTED 300
1. Het voorkomen van *Phoma apiicola* op de bovengrondsche deelen der plant 300
a. op het blad 300
b. op het zaad 302
2. De kwestie der identiteit van *Phoma apiicola* KLEBAHN en *Phyllosticta apii* HALSTED 305

HOOFDSTUK VI. Bestrijding 308

MYCOLOGISCH DEEL.
(het gedrag der schimmelvormen ten opzichte van elkaar).

HOOFDSTUK I. De overgang van den micro- en den macro-vorm in elkaar 310
1. De afsplitsing van den micro- uit den macro-vorm 310
2. De overgang van den micro- in den macro-vorm 314

HOOFDSTUK II. De locale rassen van *Phoma apiicola* en de vormen daarvan in reincultuur 317
1. De groei op verschillende voedingsbodems 317
2. Vergelijking van de locale rassen en de vormen daarvan op eenzelfden voedingsbodem 320

HOOFDSTUK III. Conjunctpycniden 324
1. De ontdekking der Conjunctpycniden 324
2. Hypothesen over het ontstaan der Conjunctpycniden 327
3. Literatuur over homo- en heterothallisme 328
4. Literatuur over de ontstaanswijze van pycniden 331
5. Onderzoek naar de mogelijkheid van bastaardeering bij *Phoma apiicola* 333

HOOFDSTUK IV. Degeneratie en regeneratie 335
1. Literatuuroverzicht 335
2. Onderzoek betreffende degeneratie en regeneratie van *Phoma apiicola* 339

English summary 344

Literatuurlijst 345
Verklaring der figuren 347

INLEIDING.

De buitengewoon groote schade, die de zoogenaamde roest- of schurftziekte veroorzaakt in centra, waar knolselderij een der hoofdgewassen vormt en de blijkbaar niet voldoende resultaten, die men met de bestrijding dezer ziekte bereikt, brachten mij ertoe te beginnen met een onderzoek omtrent de vatbaarheid van knolselderijplanten ten opzichte van deze ziekte.

Voor de bestrijding wordt in het algemeen een zaadontsmetting en een desinfectie van den grond in den zaai- en verspeenbak aangeraden. Bij het raadplegen der literatuur viel het mij op, dat er vrijwel geen positieve gegevens te vinden zijn, waaruit men met zekerheid kan afleiden, dat de zwam *Phoma apiicola*, die als de oorzaak der ziekte te beschouwen is, op het zaad aanwezig zou zijn. Van een zaadontsmetting zal men toch slechts dan gunstige resultaten kunnen verwachten, wanneer in den regel de ziekteverwekker op het zaad aanwezig is en daarop door een of andere behandeling gedood wordt.

Ofschoon vele monsters onderzocht werden, is het mij slechts eenmaal gelukt één pycnide van Phoma apiicola van een vruchtje te isoleeren. Meerdere malen waren daarentegen pycniden aanwezig van een andere zwam, die zeer gemakkelijk aangezien zou kunnen worden voor bovenbedoelden parasiet en derhalve aanleiding zou kunnen geven tot een onjuiste meening.

Naar aanleiding van dit onderzoek en van hetgeen bekend is uit de vroegere onderzoekingen, meen ik te kunnen besluiten, dat Phoma apiicola zeer zelden op het zaad aanwezig zal zijn. Van een zaadontsmetting zal men dus in 't algemeen geen gunstige resultaten kunnen verwachten (al kan het veiligheidshalve gewenscht zijn die toe te passen, terwijl dit voor de bestrijding van *Septoria apii* noodzakelijk is.)

Voorts werd gevonden, dat de parasitaire zwam ook aanwezig kan zijn op een veld, waar zeer langen tijd geen selderij of peen verbouwd werd, zoodat ik vermoed, dat andere gewassen of onkruiden een belangrijke rol spelen bij het in stand houden van den parasiet in den grond.

Het onderzoek omtrent de vatbaarheid van planten heeft twee zijden. Ten eerste kan worden nagegaan hoe de vatbaarheid van

een bepaald gewas gewijzigd wordt onder invloed van uitwendige omstandigheden; ten tweede kan de vatbaarheid van verschillende plantenrassen onder zooveel mogelijk gelijke uitwendige omstandigheden worden bestudeerd.

Voor dit laatste onderzoek werden twintig verschillende knolselderijvariëteiten, afkomstig uit Duitschland, Engeland, Frankrijk en Nederland onder dezelfde omstandigheden met elkaar vergeleken. Zoowel uit de resultaten eener kunstmatige infectieproef op jonge planten als uit het optreden eener spontane infectie op een proefveld, waar deze variëteiten ook waren uitgeplant, bleek, dat, hoewel alle variëteiten min of meer vatbaar zijn, twee ervan minder aan de ziekte onderhevig waren dan de overige.

Uit BENNETT's onderzoek (1922) bleek, dat het temperatuursoptimum van den ziekteverwekker bij ± 17° C. en het maximum bij ± 28° C. ligt. In aansluiting daaraan liet ik jonge planten groeien in geïnfecteerden grond bij een reeks van constante bodemtemperaturen van 17°—28° C.; hierbij komt de invloed op de vatbaarheid der planten en op de aantastingskracht van de schimmel niet afzonderlijk tot uiting. Deze voorloopige proef werd genomen met variëteit no. 18, die minder vatbaar, en met variëteit no. 20, die zeer vatbaar is voor deze ziekte. Ofschoon de resultaten dezer proef niet toelaten met zekerheid een conclusie te trekken, kan men er toch met eenige waarschijnlijkheid uit afleiden, dat bij de lagere temperaturen de aantasting sterker tot uiting komt, dan bij de hoogere. Bij de minder vatbare variëteit no. 18 kon de aantasting door de hoogere temperaturen meer worden teruggedrongen dan bij de meer vatbare variëteit no. 20. Ook zou men uit deze proef kunnen afleiden, dat variëteit no. 18 bij de hoogere temperaturen voor een grooter percentage kiemt dan variëteit no. 20. Hierbij doet zich de vraag voor of er een correlatief verband bestaat tusschen een hooger ontkiemingsmaximum en een grootere resistentie tegen aantasting door Phoma apiicola. Mocht dit zoo zijn, dan zou dit de selectie van een resistente variëteit ten zeerste vergemakkelijken en bespoedigen.

Intusschen waren bij het isoleeren van de zwam bijzonderheden aan het licht gekomen, die een nader onderzoek in mycologische richting noodzakelijk maakten, zoodat ik een verder onderzoek naar den invloed der verschillende temperaturen op de aantasting der planten voorloopig meende te moeten uitstellen. Aangezien dit onderzoek nog niet als afgesloten kan beschouwd worden, zijn de resultaten hier niet vermeld.

„Menigeen heeft ervaren, dat hij soms heel iets anders vond dan hij zich eerst ten doel had gesteld; dat hij dus bij zijn onderzoek derailleerde, maar vaak om op betere paden terecht te ko-

men. In zoo'n geval moeten geen scrupules een beletsel zijn om dat nieuwe doel te volgen." (BLAAUW 1919.)

Terwijl ik mij had voorgesteld een beteren grondslag te vinden voor de bestrijding der ziekte, volgens den boven aangegeven weg, bleek mij al spoedig, dat bij de vroegere onderzoekingen enkele eigenaardigheden van den ziekteverwekker niet aan 't licht gekomen waren. Uit de onderzoekingen van KLEBAHN (1919) en BENNETT (1922) is gebleken, dat Phoma apiicola KLEBAHN de oorzaak der schurftziekte is. Het feit echter, dat van deze zwam in Nederland verschillende rassen aanwezig blijken te zijn en dat deze onder bepaalde omstandigheden geheel andere vormen aannemen, die van de oorspronkelijke niet alleen morphologisch en physiologisch verschillen, doch ook een ander pathogeen karakter vertoonen, maakte een onderzoek noodzakelijk naar het voorkomen en den aard van deze vormen.

Terwijl met hetgeen in het pathologisch deel dezer verhandeling vermeld is over een macro- en een micro-vorm van Phoma apiicola en over locale rassen volstaan kan worden als inleiding tot de daar beschreven infectieproeven, is het niet voldoende voor het verkrijgen van een inzicht in het proces der afsplitsing van den micro-vorm. Dit moge dienen ter verklaring van het op 't eerste oog eenigszins eigenaardig schijnende feit, dat een mycologisch deel op het pathologisch deel volgt. Om het verschillend gedrag van den micro- en macro-vorm tot uiting te doen komen, moesten deze vormen op tal van voedingsbodems gekweekt worden en tal van infectieproeven worden gedaan; ook moesten zij worden vergeleken op een substraat, waarop ze allen wilden groeien. Bij deze proefnemingen kwam het verschil tusschen het Venlosche en het Maastrichtsche ras duidelijk te voorschijn, terwijl dit werk ook leidde tot de ontdekking der conjunctpycniden en de verschijnselen van degeneratie en regeneratie. Deze conjunctpycniden ontstaan in de lijn waar mycelia van een micro- en een macro-vorm elkaar ontmoeten, terwijl uit een nader onderzoek bleek, dat elk dezer pycniden sporen bevat van beide zwamvormen; een dergelijke pycnide is dus opgebouwd uit hyphen van twee verschillende individuën.

Het gebruik van de term heterothallisme is bij de behandeling der conjunctpycniden vermeden, omdat men daaraan de gedachte aan geslachtelijke differentiatie verbindt, waarvan hier geen sprake zal kunnen zijn. Ter kenschetsing van hun typisch gedrag ten opzichte van elkaar heb ik den micro- en den macro-vorm synergetische vormen genoemd.

De infectieproeven en het werken met de synergetische vormen had intusschen zoo'n uitbreiding verkregen, dat het verslag

daarvan als een afgerond geheel hierbij wordt gepubliceerd, voordat het onderzoek naar den invloed van verschillende temperaturen op de aantasting der planten tot afsluiting kon komen. Dit laatste gaat in een andere richting dan het onderzoek, dat het onderwerp vormt der hier volgende hoofdstukken.

PATHOLOGISCH DEEL.

HOOFDSTUK I.

DE DOOR PHOMA APIICOLA VEROORZAAKTE ZIEKTE.

1. *De naam en de economische beteekenis der ziekte.*

De ziekte der knolselderij, die men aanduidt met den naam „*roest*" of „*schurft*", komt zeer algemeen voor in tuinbouwcentra waar dit gewas op eenigszins groote schaal verbouwd wordt. De knollen der zieke planten vertoonen een ruwe, schurftachtige oppervlakte, terwijl hier en daar uit kleinere en grootere barsten een korrelige gele massa naar buiten treedt. Deze gele massa is aanleiding geweest de ziekte met den naam „roest" aan te duiden. Daar de selderij-bladeren ook door een Puccinia worden aangetast, leent de naam „roest" zich m.i. minder goed voor deze ziekte dan de naam „schurft". Deze laatste benaming wordt eveneens gebruikt voor ziekten van aardappel en biet, die zich door ruwe plekken aan de oppervlakte van het geoogste produkt kenmerken.

De ziekte beperkt zich bijna uitsluitend tot den knol en de wortels, die in ernstige gevallen geheel wegrotten. Ook het onderste gedeelte van den bladsteel, namelijk de verbreede voet, die nog juist met den grond in aanraking komt, wordt door de ziekte aangetast. Er treedt daar ter plaatse een rotting op, waardoor het blad van den knol loslaat en op den grond vergeelt. Aan de aanwezigheid dezer vroegtijdig geel geworden bladeren kan men zieke planten op het veld gemakkelijk en spoedig herkennen.

De schade, die deze ziekte veroorzaakt, is zeer belangrijk. In de omgeving van Venlo, waar veel knolselderij verbouwd wordt, treft men niet zelden velden aan, waarop bijna alle planten zijn aangetast. Knollen, die een eenigszins „schurftig" uiterlijk vertoonen, hebben daardoor alleen reeds een veel geringere waarde dan „blanke" knollen, terwijl het sterk aangetaste produkt zoo goed als waardeloos is. Voor een deel is dit daaraan toe te schrijven, dat zieke knollen absoluut ongeschikt zijn om gedurende de wintermaanden in kuilen bewaard te worden, daar zij dan spoedig geheel in rotting overgaan, welk proces zich verder in den kuil uitbreidt. De tuinders verwijderen daarom na den oogst de zieke knollen uit de partij en brengen deze mindere kwaliteit spoedig ter veiling. De prijs, dien men echter hiervoor betaald

krijgt, is meestal zeer gering, zoodat de knolselderijcultuur alleen dan als loonend beschouwd wordt, wanneer men eerste kwaliteit knollen kan telen.

Doordat het optreden dezer ziekte wisselvallig is en er geen middelen bekend zijn, waardoor men er paal en perk aan kan stellen, gaat de cultuur van dit gewas steeds met groot risico gepaard. Men neemt wel aan, dat in vochtige jaren meer schade aangericht wordt dan in droge; ook ziet men meestal, dat op natte velden de ziekte het meest en het hevigst voorkomt, maar er zijn geen nauwkeurige gegevens bekend omtrent den invloed van bodem- en weersgesteldheid op het in meer of mindere mate optreden der ziekte. Uitgaande van de waarneming, dat de ziekte in verband met den bodem scheen te staan, nam men in de praktijk proeven met verschillende bemesting, die echter niet tot bevredigende resultaten leidden.

2. *Literatuur over het optreden en de oorzaak der ziekte en over haar voorkomen op andere plantensoorten.*

Reeds langen tijd heeft men met deze ziekte te kampen gehad voordat men de oorzaak kende. Een der redenen hiervan was wel, dat zij zich bijna uitsluitend openbaart aan de onderaardsche plantendeelen, waar zoowel verschillende organismen als chemische en physische invloeden de werking van den eigenlijken ziekteverwekker vertroebelen. Door de eerste onderzoekers werden dan ook aaltjes, bacteriën, zwammen of onvoldoende luchttoevoer voor de vermoedelijke oorzaak aangezien; iedere onderzoeker had zijn eigen meening.

In Duitschland heeft deze ziekte wellicht het eerst de aandacht getrokken. Zoo sprak Steglich in1898 over het optreden van een „roest" der knolselderij in de groentekweekerijen bij Stetzsch in Sachsen. De oorzaak gaf hij niet op, doch hij was van meening, dat de ziekte reeds in het zaadbed optreedt en met de jonge planten overgebracht kan worden naar het vrije veld.

Kellermann (1903) vermeldde, dat selderijknollen, die in Nürnberg op de markt komen, een bruine schurftachtige oppervlakte hebben. Dit verschijnsel, dat reeds op het veld is opgetreden, wordt volgens hem erger in de kuilen. In de zieke knollen kon hij slechts aaltjes vinden.

Hollrung (1903) zag de ziekte bij Buhlendorf in Anhalt. Hij vond tusschen de vezels der kurkachtige schors aaltjes en schimmels, welke hij als secundaïre organismen beschouwde, terwijl hij een onvoldoenden luchttoevoer als primaire oorzaak aannam.

In verband daarmede raadde hij drainage aan en een ruime bemesting met organischen mest.

Een geheel andere meening was JAUCHEN (1909) toegedaan. In zijn mededeelingen handelende over de groente-teelt in de omgeving van Zerbst vindt men de volgende opmerking. „Seit sechs bis acht Jahren leidet der Zerbster Sellerie sehr an die Schorfkrankheit, die seine Ursache jedenfalls in der Überdüngung mit Stalldünger hat." De bodem, waarvan hier sprake is, is een zwarte, doorlatende grond, die jaarlijks met 3—4000 Zentner (150.000—200.000 kg) stalmest bemest werd.

In 1907 begon KLEBAHN (1910) zijn nauwkeurig onderzoek naar de oorzaak dezer ziekte, die in de Hamburger broeklanden een ware plaag voor de tuinders geworden was. KLEBAHN onderzocht het weefsel, dat lag op de grens van het zieke en gezonde knolgedeelte en het gelukte hem daar een schimmel te ontdekken, die tot in het gezonde weefsel doordrong. Door isolatie en daaropvolgende infectie kon hij met groote waarschijnlijkheid bewijzen, dat deze schimmel de oorzaak der ziekte is. Deze zwam was in de literatuur nog niet beschreven en werd door KLEBAHN *Phoma apiicola* genoemd.

TEMPEL deelde in 1926 mede, dat de schurftziekte der knolselderij, die STEGLICH reeds vroeger in de Dresdener culturen aantrof, ook toen nog in die streek veel voorkwam.

Over het optreden dezer ziekte in Nederland is in de literatuur niet veel vermeld. Wel beschrijft RITZEMA BOS (1903) een selderijziekte, waarvan de beschrijving eenigszins doet denken aan de schurftziekte, doch met zekerheid is het er niet uit op te maken. R. B. vermeldt, dat hij de bedoelde ziekteverschijnselen kon teweegbrengen door een reincultuur van bacteriën, die hij uit deze zieke knollen geïsoleerd had.

QUANJER en SLAGTER (1914) stelden een onderzoek in omtrent de oorzaak der schurftziekte, die vooral in de omgeving van Venlo veel schade veroorzaakte. Ook trachtten zij een bestrijdingswijze te vinden. Hun resultaat is niet in strijd met dat van KLEBAHN; zij toonden aan, dat de ziekte waarschijnlijk veroorzaakt werd door een op *Phoma apiicola* KLEBAHN gelijkende zwam en dat met het ontsmetten van het zaadbed verbetering is te verkrijgen, tenminste, wanneer daarna de jonge plantjes uitgezet worden op land, waar voordien nog geen knolselderij geteeld is.

Volgens PETHYBRIDGE (1926) kwam deze ziekte tot in 1924 in Engeland niet voor. In dat jaar werd echter op de wortels van kiemplantjes van knolselderij, die aan „damping off" leden, een zwam gevonden, die P. voor *Phoma apiicola* KLEBAHN hield. Daar er echter blijkbaar met de geïsoleerde zwam geen infectie-

proeven uitgevoerd werden en de ziekteverschijnselen, door deze zwam bij oudere knollen veroorzaakt, niet werden nagegaan, is het niet bewezen, dat de gevonden zwam inderdaad *Phoma apiicola* KLEBAHN geweest is.

Ook in Amerika heeft men blijkbaar langeren tijd met deze ziekte te kampen gehad. In de literatuur van dit land toch vindt men vele gevallen van „Celery-root rot" vermeld, waarvan de beschrijving aan de schurftziekte doet denken, o.a. beschreef VAN HOOK in 1907 een dergelijk geval.

In 1917 bewees COONS, dat in Amerika een Phoma sp. de oorzaak is van een ziekte in de knolselderij, die veel gelijkt op wat in Europa aangeduid wordt met den naam „roest" of „schurft". COONS vergeleek het door hem geïsoleerde Phoma ras met de Phoma sp., die hij ontving uit het Centraal Bureau voor Schimmelculturen, destijds te Amsterdam. Het bleek hem, dat de door hem geïsoleerde Phoma sp. in cultuur en in pathologische eigenschappen zeer veel op de uit Holland ontvangen zwam geleek. Hij concludeerde daaruit, dat de door hem uit de zieke knolselderij geïsoleerde zwam identiek is met *Phoma apiicola* KLEBAHN.

Uit de lijst van cultures van het Centraal Bureau blijkt echter, dat de daar gecultiveerde zwam afkomstig is van de isolaties verricht *niet* door KLEBAHN, doch door QUANJER en SLAGTER, zoodat COONS' conclusie niet geheel juist behoeft te zijn.

BENNETT publiceerde in 1922 een eenigszins uitgebreid onderzoek naar het voorkomen, den aard en de eigenschappen van de zwam.

Hij vermeldt, dat de ziekte optreedt in de Staten Ohio, Michigan en New York, welke staten alle gelegen zijn in het Noord-Oosten van de Amerikaansche Unie. Aan de Pacifische kust en in de meer Zuidelijk gelegen districten, waar vooral het zaad gewonnen schijnt te worden, komt de ziekte volgens BENNETT niet voor.

Ook BENNETT vond geen verschil tusschen het door hem in Michigan geïsoleerde en het uit Europa ontvangen schimmelras.

Het voorkomen der zwam op andere planten. BENNETT bewees door infectieproeven, dat de door hem geïsoleerde *Phoma apiicola* KLEBAHN ook peen (*Daucus carota* L.) aantast. Op de peenwortel ontstaan ingezonken zwarte vlekken, waar pycniden gevonden worden, terwijl de buitenste bladeren afvallen. Pastinaak (*Pastinaca sativa* L.) is eveneens vatbaar, ofschoon niet in dezelfde mate als peen; er ontstaan slechts bruine, donkere vlekken en hier en daar scheurt de epidermis. Peterselie (*Petroselinum sativum* HOFFM.) is even vatbaar als knolselderij.

Karwij (*Carum carvi* L.) is zeer weinig vatbaar, terwijl de gevlekte scheerling (*Conium maculatum* L.) en dille (*Anethum graveolens* L.) onvatbaar zijn.

BENNETT heeft verder veel wetenswaardigs over reincultures en over den invloed van uitwendige omstandigheden op de zwam vermeld; ik kom daarop terug in de volgende hoofdstukken.

3. *Ziekte-symptomen.*

Weinig aangetaste planten vertoonen op den overigens witten knol ondiepe, roestachtige vlekken, die uit een korrelige gele massa blijken te bestaan. Snijdt men zulk een knol door, dan ziet men, dat onder deze vlekken het weefsel donker van kleur is; soms is deze verkleuring scherp begrensd, terwijl op andere plaatsen de donkere kleur langzaam overgaat in het wit van het gezonde weefsel.

Aan de fijnere wortels ziet men op meerdere plaatsen gele vlekjes: voornamelijk komen deze voor bij de inplanting aan den knol en bij de wortelvertakkingen. Op deze plekken treedt een rotting op, waardoor zij gemakkelijk afbreken. Ofschoon men deze vlekjes vooral op de wortels aan den hals van den knol vindt, ziet men ze toch ook op de lagere, die dieper in den grond zitten.

Ernstig aangetaste knollen (zie plaat XVI figuur 1 en 2) hebben een rimpelige, schurftachtige oppervlakte, en in sommige gevallen een zwarte kleur. Dit laatste schrijf ik meer toe aan het sterk blijven kleven van humus- en grondbestanddeelen aan het zieke weefsel, dan aan de directe werking van de zwam. Aan den hals van dergelijke knollen ziet men vaak diepe, vertikaal loopende kloven, die ontstaan doordat het buitenste zieke weefsel den diktegroei van het meer naar binnen gelegen gezonde weefsel niet kan volgen. Van zulke ernstig aangetaste planten zijn alle fijnere wortels, zoowel die, welke aan den hals van den knol ontspringen als de dieper gelegene, geheel weggerot. Het gevolg hiervan is, dat deze planten zeer los in den grond staan en er zonder inspanning uitgetrokken kunnen worden; de knollen dezer planten zijn meestal klein van stuk. Dit wegrotten der wortels heeft in Amerika blijkbaar aanleiding gegeven tot den naam „rootrot". Ter onderscheiding van andere wortelrot-ziekten gebruikt BENNETT voor deze ziekte den naam „Phoma rootrot".

Een aantasting der bladeren of stengels komt in ons land onder de heerschende temperatuurs- en weersomstandigheden blijkbaar niet voor; noch in de literatuur noch in de praktijk is daarover iets bekend. De eenige plaats, waar de pycniden der zwam op bladdeelen aangetroffen worden, is de verbreede voet van den blad-

steel, daar waar deze op den knol is ingeplant. Dit is niet te verwonderen aangezien deze voet juist voorkomt op de grens van grond en lucht, een plaats, die volgens het onderzoek van BENNETT, zeer gunstig is voor de ontwikkeling der zwam. Dat dit niet toe te schrijven is aan een grootere vatbaarheid van het basaal gedeelte van den bladsteel blijkt uit het volgende: plaatst men jonge planten wat dieper dan gewoonlijk in den grond, dan worden de bladstelen waar zij uit den grond te voorschijn komen sterker aangetast dan aan hun dieper gelegen voet. Dat men op de verbreede steelgedeelten de pycniden gemakkelijker vindt dan op den knol, komt wel daardoor, dat de pycniden goed afsteken tegen de lichtere kleur der stelen, die niet direct in rotting overgaan en ook niet zoo sterk door grond verontreinigd zijn als de knol.

De bladsteelaantasting beperkt zich tot den buitensten bladkrans; de stelen der jongere bladen worden door de oudere voor aantasting van den grond uit blijkbaar beschermd.

Een door deze ziekte aangetast veld heeft zijn groene kleur aanvankelijk nog niet verloren; aan den oplettenden toeschouwer verraden echter de vroegtijdig afgestorven bladeren, die als een krans om de zieke knollen op den grond liggen, de aanwezigheid der ziekte.

HOOFDSTUK II.

ISOLATIE VAN PHOMA APIICOLA KLEBAHN.

1. *Isolatie en Kweekmethoden.*

Uitgangsmateriaal. Als uitgangsmateriaal gebruikte ik in hoofdzaak zieke planten, afkomstig van velden uit de omgeving van Venlo (zwarte humusrijke zandgrond) en van Maastricht (kleigrond). [1])

De knollen, waarmee ik in Januari 1926 het onderzoek begon, waren een tijd lang in een vorstvrijen kelder bewaard. Het gelukte mij niet pycniden te vinden, zoodat ik ter isoleering van de zwam uitging van stukjes knol, uitgesneden op de grens van het zieke en gezonde weefsel.

Toen ik in den herfst van dat jaar in beide tuinbouwcentra versch materiaal kon verzamelen, gelukte het mij op alle zieke knollen, zoowel op den voet van den verbreeden bladsteel als op den knol zelf, vele pycniden te vinden. De cultures, die ik door uitzaaiing der pycnosporen verkreeg, werden toen vergeleken met de cultures, die ik in het voorjaar verkregen had uit de knolstukjes.

Isolatie van mycelium. Kleine stukjes knol, steriel gesneden op plaatsen, waar de donkere verkleuring van het zieke weefsel overgaat in de witte kleur van het gezonde, werden in verschillende petrischalen op selderij-agar uitgelegd (zie voor de samenstelling van deze agar pag. 284). Uit al deze stukjes kwamen spoedig groote massa's bacteriën te voorschijn zonder dat er iets van mycelium te bespeuren was. Bij een tweede poging, waarbij de stukjes iets dieper uit den knol gesneden waren, trad er bij enkele stukjes naast bacterie-ontwikkeling ook een mycelium op. Door eenige overentingen kon een witgrijze zwam, die veel luchtmycelium vormde, geïsoleerd worden.

Daar op grond van BENNETT's onderzoek verwacht kon worden, dat op gesteriliseerde knolselderij Phoma apiicola spoedig pycniden zou vormen, werd de geïsoleerde zwam in een aantal buizen op dezen voedingsbodem geënt.

---

[1]) Het past hier een woord van dank te brengen aan Ir. W. G. VAN DER KROFT, Rijkstuinbouwconsulent te Maastricht en W. DRIESSEN, tuinder te Venlo, die ik steeds gaarne bereid vond mij behulpzaam te zijn, hetzij met het verstrekken van gegevens of met het verzamelen en toezenden van zieke planten.

Door meting der pycniden en pycnosporen en daarop volgende infectie van planten zou met voldoende zekerheid zijn uit te maken of de geïsoleerde zwam met de door KLEBAHN bedoelde overeenkwam.

Het was verder mijn plan door uitzaaiing eener verdunde sporensuspensie éénsporecultures te verkrijgen. Wanneer men een zeer dunne laag agar gebruikt en zorgt, dat er op een plaat niet meer dan 20 of 30 sporen terecht komen, kan men met voldoende zekerheid onder het microscoop éénsporecultures isoleeren, vooral wanneer men deze uitzaaiing eenige malen herhaalt.

Voedingsbodems. BENNETT kweekte de zwam o.a. op standard nutrient agar, dextrose agar, gekookte rijst, COONS' en RICHARDS' synthetische voedingsoplossing, gekookte knolselderij enz. Op gekookte knolselderij en vooral op filtreerpapier, gedrenkt in COONS' voedingsoplossing, werden pycniden gevormd. De meest voor mijn onderzoek gebruikte voedingsbodems bestonden uit gestoomde plantendeelen of plantaardige aftreksels, die door agar vast gemaakt werden. Een nadere beschrijving hiervan is niet noodig. Alleen volge hier een korte opgave van enkele voedingsbodems, waarvan in dit onderzoek meermalen sprake is en die een nadere aanduiding behoeven.

Selderij-agar. 500 gram selderij-knol in stukken snijden; gedurende 2 à 2½ uur koken in 1½ L. water .De selderij-stukjes uitpersen, de vloeistof warm filtreeren en daarna aanvullen tot 1½ L. Na bekoeling opnieuw filtreeren, verwarmen en dan 1½ L. warme 3 % agar-oplossing toevoegen. Zoo noodig andermaal filtreeren.

Selderij-stelen. Stukjes bladstelen ter lengte van ongeveer 7 à 8 cm werden in een cultuurbuis gezet in het benedeneinde waarvan een kleine hoeveelheid water gebracht was, zoodat het in de buis voldoende vochtig bleef. Later werd gevonden, dat deze voedingsbodem nog te verbeteren was door de stelen, na de sterilisatie met behulp van een steriele ronde staaf tegen den glaswand plat te drukken. Men verkrijgt op die manier een gelijkmatige dunne voedingsbodem, waarop ook de beide macro-vormen nog spoediger dan op niet platgedrukte stelen hun pycniden doen ontstaan. Plaat XVII, fig. 3.

Bladaftreksel. Afgestorven bladeren, die in den herfst op een selderijveld verzameld waren, werden in een verwarmde kamer te drogen gelegd, vervolgens door een warme luchtstroom verder gedroogd.

Vijftien gram dezer droge bladeren werden gedurende 2 à 3 uur in 1 L. water gekookt. De vloeistof werd daarna gefiltreerd en aangevuld tot 1 L. en na bekoeling opnieuw gefiltreerd.

Coons' synthetische voedings-oplossing. (1916). Alvorens de eigenlijke voedingsoplossing samen te stellen, kan men gemakshalve vooraf de volgende geconcentreerde oplossingen ($M/_5$) gereed maken.

Magnesiumsulfaat + 7 aq..	2,466 gr.	+	50 cc.	water.
Monokaliumfosfaat	1,36 ,,	+	50 ,,	,,
Asparagine	1,33 ,,	+	50 ,,	,,
Maltose	3,60 ,,	+	50 ,,	,,

Voor 100 cc. voedingsoplossing neme men 1 cc. van deze magnesiumsulfaat- en van deze asparagine-oplossing; en 5 cc. van elk der beide overige geconcentreerde oplossingen; tenslotte voege men 88 cc. water toe.

Richards' synthetische voedings-oplossing. (Pratt 1924).

Kaliumnitraat	10 gram.
Monokaliumfosfaat	5 ,,
Rietsuiker.....	50 ,,
Magnesiumsulfaat	2,5 ,,
IJzerchloride.....	een spoor.
Water	1000 c.c.

Gebruik der vloeibare voedings-oplossingen. Deze drie voedingsoplossingen werden op de volgende manier gebruikt. In cultuurbuizen werd een opgerold stuk filtreerpapier gezet, dat tot $\frac{3}{4}$ van de hoogte der buis reikte. In de buis werd vervolgens 10 cc. van een der voedingsoplossingen gegoten. De buizen werden daarna gesteriliseerd.

Sterilisatie geschiedde steeds door plaatsing op drie achtereen volgende dagen in een autoclaaf bij $\frac{1}{2}$ atm. overdruk.

2. *Een micro- en een macro-vorm van Phoma apiicola* Klebahn.

De cultuurbuizen met de gesteriliseerde knolselderij, waarop het geïsoleerde mycelium geënt was, werden geplaatst in diffuus daglicht bij kamertemperatuur (17°—21° C.). Twintig dezer buizen waren aanwezig zoowel met de cultures geïsoleerd van de Maastrichtsche als van de Venlosche zieke knollen.

Zeer spoedig werd in al deze buizen overvloedig mycelium gevormd, zoodat zij na korten tijd geheel daarmee gevuld waren. Aanvankelijk waren geen pycniden te zien; de eerste werden opgemerkt na een maand, terwijl er daarna meer ontstonden. Het viel mij echter op, dat het aantal pycniden in deze buizen

nogal verschilde. Dit was zoowel het geval bij de Maastrichtsche als bij de Venlosche cultures.

Uit eenige buizen van beide partijen werden een aantal pycniden geïsoleerd en hiervan een verdunde sporensuspensie uitgezaaid in petrischalen in een kleine hoeveelheid lauwwarme agar.

Daar op dat oogenblik geen selderij-agar meer aanwezig was, werden de op dezen agar ontkiemde sporen overgebracht in schalen met kers-agar en deze in een thermostaat bij 24° C. geplaatst. Na een paar dagen bleek dat sommige dezer cultures niet uitgegroeid waren. Dit was het geval zoowel bij de Maastrichtsche als bij de Venlosche isolaties. Op de plaats, waar de ontkiemde sporen geënt waren, hadden zich in den agar bruine korreltjes gevormd. Andere overgebrachte ontkiemde sporen groeiden uitstekend en vormden een dik grijsachtig wit mycelium.

Ofschoon dergelijke slecht-groeiende cultures zoowel bij de Maastrichtsche als bij de Venlosche isolaties werden geconstateerd, dacht ik aanvankelijk nog aan ongunstige omstandigheden, die sommige der overentingen hadden doen mislukken. Om hieromtrent zekerheid te verkrijgen, werd de geheele hiervoor beschreven isolatie nogmaals uitgevoerd. Het resultaat was hetzelfde als hiervoor is weergegeven. Het lag toen voor de hand te veronderstellen, dat zoowel bij de Venlosche als bij de Maastrichtsche isolaties twee verschillende zwamvormen aanwezig waren, waarvan de eene goed op kers-agar groeit de andere niet.

Om nader uit te maken of deze veronderstelling juist was, werden pycnosporen, zoowel der Venlosche als der Maastrichtsche cultuur, afkomstig van bovengenoemde gesteriliseerde knolselderij, uitgezaaid op selderij-agar, daarnaast ook op kers-agar. Het bleek spoedig, dat de ontkieming op selderij-agar vlugger plaats vond dan op kers-agar en verder dat een temperatuur afwisselend tusschen 17° en 21° C. een weinig gunstiger was dan een constante temperatuur van 24° C., zooals onderstaand lijstje nader moge aantoonen. Er was ook in dit opzicht geen verschil te constateeren tusschen de Venlosche en Maastrichtsche isolaties.

Tijd, noodig voor het zichtbaar worden der kolonies van Venlosche en Maastrichtsche herkomst.

Uitgezaaid in	Bij 17°—21° C.	Bij 24° C.
Selderij-agar.....	4 dagen	4 dagen
Kers-agar	7 dagen	8 dagen

Deze proef was in triplo uitgevoerd. De zeer jonge kolonies in de 3 × 4 petrischalen waren met het bloote oog niet van elkaar te onderscheiden en niets deed vermoeden, dat twee vormen aanwezig zouden zijn.

Eenige geheel afzonderlijk liggende kolonies werden uit de petrischalen met selderij-agar afgezonderd en overgebracht op andere schalen met selderij-agar. De helft dezer schalen werd gezet bij een wisselende temperatuur van 17°—21° C., de andere helft bij een constante temperatuur van 24° C. Thans groeiden alle geïsoleerde kolonies uitstekend bij beide temperaturen.

Spoedig kon men nu met het bloote oog twee vormen onderscheiden. Er waren kolonies, die spoedig een dik wollig mycelium vormden, aanvankelijk wit, later grijs van kleur, waarin geen pycniden gevormd werden. Andere kolonies maakten niet zoo'n wollig mycelium doch de hyphen groeiden vlak over en in de agar en vormden, in tegenstelling met die van de andere zwamvorm, spoedig een groot aantal kleine pycniden. (Plaat XVII fig. 4.) Deze laatste kolonies groeiden na overenting op kers-agar bij 24° C. niet verder uit, hetgeen dus werkelijk mijn vermoeden bevestigde, dat er een vorm in mijn cultures aanwezig was, die niet of moeilijk op kers-agar groeide.

Van de sporen, uitgezaaid op kers-agar, werden er eveneens een aantal na ontkieming overgebracht zoowel op schalen met selderij-agar als op schalen met kers-agar. De helft van iedere partij schalen werd wederom gezet bij een constante temperatuur van 24° C., de andere helft bij een wisselende temperatuur van 17°—21° C. Alle aanwezige kolonies ontwikkelden zich op de twee voedingsbodems bij beide temperaturen tot witte, wollige myceliën, waarin geen pycniden te zien waren. Op de kers-agar, waarin de sporen gezaaid waren, was dus blijkbaar maar één vorm tot ontwikkeling gekomen, of de ,,pycnide vorm'' was door den ,,mycelium vorm'' overwoekerd. De kers-agar had in dit opzicht selectief gewerkt.

Toen de petrischalen met kers-agar 17 dagen na de uitzaaiing nog eens nauwkeurig bekeken werden, zag ik op sommige open plekken enkele achterblijvers als een bruine punt zichtbaar worden. Een daarvan werd overgebracht op kers-agar en bij een temperatuur van 24° C. geplaatst; er trad geen verdere groei op, maar wel werden na eenigen tijd weer de bruine korreltjes zichtbaar, waarvan hierboven reeds sprake was. Een andere dezer achterblijvers werd eveneens op dezen voedingsbodem overgebracht, doch bij 17° C. geplaatst. De groei was in de eerste weken zeer gering; later schijnt de schimmel zich echter te hebben aangepast aan het minder gunstige substraat, althans er is na langen

tijd een kolonie ontstaan, die weinig luchtmycelium, doch wel veel kleine pycniden vormde. De groei was echter zeer matig.

Ook op de kers-agar waren, zooals nu te verwachten was, de beide verschillende zwammen aanwezig geweest, doch doordat deze voedingsbodem voor een ervan minder geschikt is, werd deze door de andere spoedig overwoekerd. Uit het voorgaande blijkt, dat wij te maken hebben met twee vormen; een van deze groeit niet goed op kers-agar; op selderij-agar vormt hij weinig luchtmycelium, maar vele kleine pycniden. Ik noem dezen daarom in het vervolg den „micro-vorm". De andere groeit uitstekend zoowel op selderij- als op kers-agar, vormt veel luchtmycelium, maar, zooals later zal blijken, veel minder pycniden en dan nog slechts op bepaalde voedingsbodems; deze pycniden, die na langeren tijd ontstaan, zijn grooter dan die van den vorigen vorm; ik noem hem daarom den „macro-vorm". De groeiwijze en de pycniden van den „macro-vorm" komen overeen met de beschrijving, die door KLEBAHN van *Phoma apiicola* gegeven wordt.

Om de afmetingen der pycniden van deze beide vormen te kunnen vergelijken moet men ze kweeken op een voedingsbodem, waarop zij spoedig en veel pycniden vormen. Verschillende methoden en voedingsbodems werden beproefd. De volgende methode werd ten slotte het best bevonden. De beide vormen werden gekweekt in cultuurbuizen op plat gedrukte selderij-bladstelen; deze buizen werden geplaatst in diffuus daglicht bij een wisselende temperatuur van 17°—21° C. Niet alleen de beide micro-vormen, doch ook de beide macro-vormen maakten onder deze omstandigheden zeer spoedig pycniden. Nadat er van elk der vormen een voldoend aantal aanwezig was, werd de platgedrukte steel uit de buis gehaald en overgebracht op enkele objectglaasjes; de pycniden werden daarna met behulp van het microscoop gemeten.

De diameter der pycniden van den Venloschen macro-vorm varieerde van 175—420 μ, zooals nader blijkt uit (Graphiek 2). Het viel mij op, dat de pycniden, die het verst van de entplaats ontstaan waren, dus blijkbaar de jongste, een lichtgele kleur en een zwarten mond hadden; de overige pycniden waren geheel zwart gekleurd. Deze lichtgeel gekleurde waren over het algemeen kleiner dan de zwarte. Blijkbaar gaat met het ouder worden der pycniden de gele kleur over in zwart, terwijl zij dan ook nog wat in grootte toenemen.

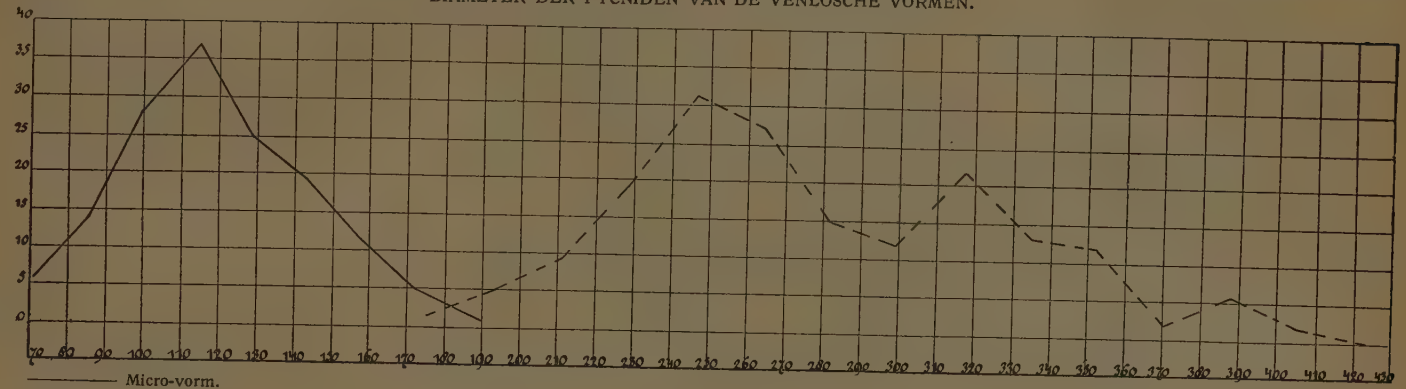
De diameter der pycniden van den Venloschen micro-vorm varieerde van 70—185 μ. (Graphiek 1.)

De sporen dezer beide pycniden-soorten werden gemeten in een 10 % gelatine-oplossing (om Brownsche beweging te voorkomen)

Graphiek 1 en 2.

Aantal.

DIAMETER DER PYCNIDEN VAN DE VENLOSCHE VORMEN.



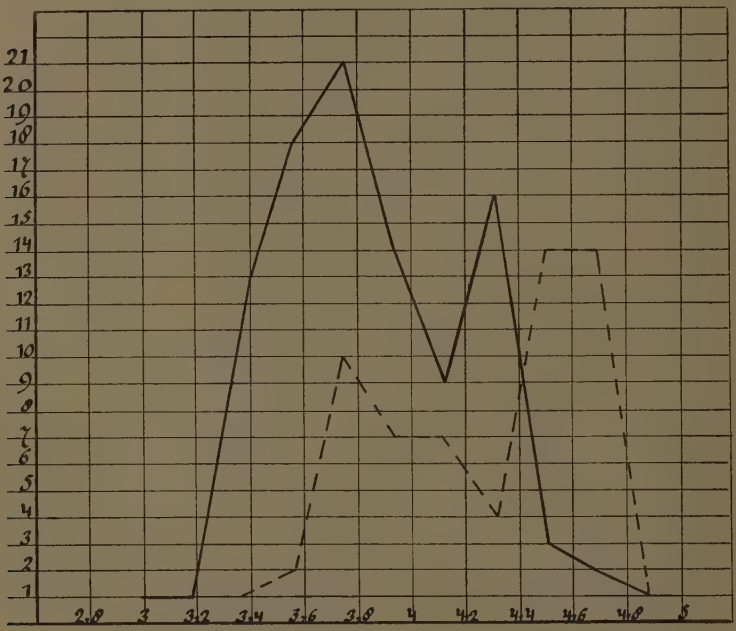
——— Micro-vorm.

– – – – – Macro-vorm.

Lengte in μ.

Graphiek 3 en 4.

Aantal. LENGTE DER SPOREN VAN DE VENLOSCHE VORMEN.



——— Micro-vorm.
– – – – Macro-vorm.

Lengte in μ.

en zij werden gekleurd met Gentiaan-violet. Zooals uit graphiek 3 en 4 blijkt, is de variatiebreedte der sporengrootte der beide zwam-vormen ongeveer gelijk (nl. van 3,37—4,87 en van 2,99—4,87); alleen heeft het grootste aantal der sporen van den macro-vorm grootere afmetingen, terwijl het grootste aantal der sporen van den micro-vorm kleinere afmetingen heeft. Doordat enkele buizen met den macro-vorm wegens een opgetreden verontreiniging werden verwijderd, is van dezen zwamvorm een kleiner aantal sporen gemeten dan van den micro-vorm.

3. *Locale rassen.*

Daar à priori met de mogelijkheid rekening moest worden gehouden, dat de Venlosche, van humusrijken zandgrond afkomstige, en de Maastrichtsche, van kleigrond afkomstige zwam, in pathogene eigenschappen zouden verschillen, zijn alle infectieproeven met cultures van beide herkomsten verricht. Eerst later, toen ik zocht naar de beteekenis van het afsplitsen der micro-vormen, kwamen bepaalde verschillen tusschen de Venlosche en de Maastrichtsche zwam voor den dag, die mij aanleiding gaven ze te beschouwen als locale rassen. In pathogeen karakter verschillen zij echter niet van elkaar, zoodat de beschrijving ervan eerst in het mycologische deel zal worden gegeven. De zwam, die gekweekt werd uit een zieken knol geoogst te Wageningen van humusarmen zandgrond, kwam overeen met het Maastrichtsche ras.

HOOFDSTUK III.

INFECTIE-PROEVEN.

Infectieproeven werden genomen zoowel met mycelium als met sporen van de beide vormen der Venlosche en Maastrichtsche culturen. Was een dergelijk onderzoek reeds noodzakelijk voor de beide macro-vormen, die in algemeene habitus en eigenschappen overeenkomen met *Phoma apiicola* KLEBAHN, nog meer was dat 't geval voor de beide micro-vormen, die in een zeer belangrijke eigenschap, nl. die der pycniden-vorming, afwijken van het door KLEBAHN beschreven type.

1. *Met mycelium.*

Wijze van uitvoering. De infecties werden verricht in 4 afzonderlijke, geheel afgesloten infectiecellen van de kassen van het laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek der Landbouwhoogeschool te Wageningen.

Deze cellen werden eerst grondig gereinigd, daarna werd alles met warm sodawater afgewasschen. Een ongewenschte infectie was daardoor zoo goed als uitgesloten. In iedere cel werden vervolgens geplaatst 4 uitgekookte zaaipannen, gevuld met gekookten grond (een mengsel van kleigrond, turfmolm en zand). In elk der zaaipannen werden telkens 12 jonge selderijplantjes gepoot, die drie loofblaadjes hadden. Deze plantjes waren gezaaid en eenmaal verplant in zaaipannen met grond, die beide door koken kiemvrij gemaakt waren. Het gebruikte zaad was ontsmet met een 0,25 % formaldehyde oplossing gedurende dertig minuten, hetgeen volgens H. R. A. MULLER (1925) voldoende is om op het zaad aanwezige *Septoria apii* te dooden.

In de zeer vele partijtjes contrôle-planten, die ik gedurende dit onderzoek noodig had, zijn inderdaad geen parasitaire ziekten opgetreden, hoewel ik meermalen heb geconstateerd, dat op het gebruikte zaad Septoria-pycniden aanwezig waren. Deze zwam is dus zeer waarschijnlijk door de behandeling met formaline gedood.

De in de cellen gepoote plantjes heb ik, alvorens tot infectie over te gaan, weer zoover aan den groei laten komen, dat circa 5 blaadjes aanwezig waren. Daarna werden in elk der 4 cellen 2 × 12 planten (2 zaaipannen) geïnfecteerd met één der reincultures; de twee andere zaaipannen met planten dienden voor contrôle. Deze contrôle-pannen stonden op eenigen afstand van

de geïnfecteerde, zoodat ongewenschte besmetting niet gemakkelijk plaats kon hebben. De vier reincultures waren gegroeid op steriele, gekookte rijst in Erlenmeyerkolven.

De infectie werd aldus uitgevoerd. Rondom den voet van de te infecteeren plant werden wat rijstkorrels gelegd, waarop de zwam aanwezig was. Uit vroegere proefnemingen was gebleken, dat een dergelijke infectie zeer goed slaagde. Deze infectie had met alle vier de cultures op dezelfde manier plaats.

Uitwendige omstandigheden. Er werden geen bijzondere maatregelen getroffen om de infectie gemakkelijk te doen plaats hebben. Er werd slechts zooveel water gegeven als noodig was voor een goeden groei der planten. De temperatuur varieerde van 16° tot 22° C.

Resultaten. Na ongeveer 14 dagen waren bij de met den Venloschen macro-vorm geïnfecteerde planten verschijnselen van aantasting te zien; de stelen der buitenste bladeren vertoonden bij de grondoppervlakte donkere, later inrottende vlekken; spoedig daarna vielen deze bladeren om en zij begonnen te verwelken. Een week tot 10 dagen later waren dezelfde verschijnselen waar te nemen bij de Venlosche en Maastrichtsche micro-vormen. De Maastrichtsche macro-vorm (de cultuur aangeduid met Ms.1) had nog steeds geen ziekteverschijnselen teweeg kunnen brengen.

Daar bij de infectieproeven met de Maastrichtsche en Venlosche zwam-rassen, nu eens dit dan weer dat ras meer virulent bleek, geloof ik dat dit verschil in pathogeen karakter niet te beschouwen is als een essentieel verschil tusschen deze twee rassen, doch dat het is toe te schrijven aan het verlies van infectievermogen als gevolg van groei op voor de zwam ongeschikte voedingsbodems of aan andere voor de zwam ongunstige omstandigheden.

De cultuur van den Maastrichtschen macro-vorm (Ms.1) was, alvorens ze overgeënt werd op rijst, langen tijd gegroeid op selderij-agar. Ik schrijf het hieraan toe, dat deze cultuur aan infectievermogen meer ingeboet heeft dan de Venlosche macro-vorm, die gedurende dien tijd steeds gegroeid was op gesterili seerde rijst, een zeer lang vochtig blijvend en meer voedingsstoffen bevattend medium.

Toen de planten nog steeds niet door den Maastrichtschen macro-vorm (Ms.1) waren aangetast, werden zij nog eens geïnfecteerd door een cultuur, die enkele malen opnieuw uit een later te beschrijven „conjunctpycnide" was afgezonderd, nl. de cultuur Ms.1 (11). (Zie voor de beteekenis dezer aanduiding het Mycologisch deel, Hoofdstuk IV § 2). Na korten tijd ($\pm$ 7 dagen) werden thans ook deze planten ziek onder dezelfde verschijnselen als

reeds in drie der bovengenoemde infectiecellen waren opgemerkt.

Toen de vier partijen geïnfecteerde planten kleine knolletjes gevormd hadden, werden enkele ervan uit iedere cel verwijderd en op 't laboratorium nader onderzocht. Het bleek, dat in alle vier de groepen typische schurftziekte was opgetreden. Op de knollen waren zeer veel spleten te zien, waaruit hier en daar een korrelige gele massa te voorschijn kwam. Op de knolletjes werden pycniden aangetroffen.

In de infectiecellen stierven later sommige planten doordat de knolletjes en wortels in rotting overgingen; andere planten hadden niet in die mate van de ziekte te lijden. In de contrôle-pannen waren daarentegen alle planten gezond gebleven en wel in elk der 4 infectiecellen.

Her-isolatie der vier zwamvormen. Van elk der vier partijen zieke planten, die met mycelium van één der vier verschillende zwamvormen geïnfecteerd waren, werden pycniden geïsoleerd. Verdunde pycnosporensuspensies werden uitgezaaid in petrischalen met selderij-agar. Van elk der vier uitzaaisels werden 50 afzonderlijk liggende kolonies in andere petrischalen overgeënt; zoo kon de groeiwijze der verschillende vormen goed beoordeeld worden. Spoedig bleek, dat van elke partij planten de zwamvorm, waarmee zij geïnfecteerd was, teruggewonnen kon worden.

Niet alleen was 't nu duidelijk, dat de beide micro- en macrovormen onveranderd waren gebleven, doch door overenting op Coons' voedingsoplossing bleek eveneens, dat het verschil tusschen de Venlosche en Maastrichtsche vormen nog aanwezig was.

Uit deze infecties en her-isolaties blijkt overtuigend, dat zoowel de beide micro- als de beide macro-vormen, ieder voor zich, de knolselderij schurftziek kunnen maken.

2. *Met pycnosporen.*

Behalve de infectieproeven met mycelium bij den voet der planten, werden ook proeven genomen met pycnosporen van elk dezer vier zwamvormen.

Wijze van uitvoering. In ieder der hierboven besproken infectiecellen waren tegelijkertijd twee groote gedesinfecteerde bloempotten met gekookten grond aanwezig. In ieder dezer potten waren telkens vier gezonde selderijplantjes gepoot, afkomstig van dezelfde partij, die voor de vorige proef gebruikt was. Nadat deze circa vijf blaadjes gekregen hadden, werden in iedere cel

de plantjes van één bloempot bespoten met een sporensuspensie van één der vier zwamvormen. De tweede aanwezige bloempot met planten, in iedere cel, bleef ter contrôle onbespoten.

Uitwendige omstandigheden. Om de infectie gemakkelijker te doen plaats hebben, werden over deze bloempotten glazen klokken geplaatst. Hieronder kon men door een eenigszins ruime begieting de vochtigheid zeer hoog houden, zoodat de blaadjes steeds vochtig bleven. Door middel van een ingebrachten psychrometer werd de relatieve vochtigheid bepaald; deze wisselde gedurende de proef van 95—100 %. De temperatuur was, evenals bij de vorige infectieproef, 16°—22° C.

Resultaten. Ongeveer een 10-tal dagen na de bespuiting met de sporensuspensie traden zoowel bij de planten, die bespoten waren met den Venloschen-, als bij de planten, die bespoteu waren met den Maastrichtschen micro-vorm, de eerste verschijnselen der ziekte op: de blaadjes gingen eenigszins slap hangen, terwijl later doffe, geel wordende vlekken over de geheele bladschijf zichtbaar werden. Het best ontwikkelden zich deze vlekken aan den top van het blad. Tenslotte kwamen zeer veel kleine pycniden te voorschijn, die zich niet alleen tot de bladschijf beperkten, doch ook in groot aantal op de bladstelen te vinden waren. Van de planten bleef tenslotte niet veel meer over dan doode bladstelen, bezet met pycniden.

De Venlosche macro-vorm kon de ziekteverschijnselen niet zoo spoedig teweeg brengen, het duurde eenige dagen langer, terwijl bij den Maastrichtschen macro-vorm de ziekteverschijnselen eerst na achttien dagen zichtbaar werden. Pycniden werden slechts in zeer enkele gevallen op deze vlekken aangetroffen. De vlekken traden ook lang niet zoo algemeen op als dat bij den micro-vorm het geval was, slechts hier en daar ontwikkelden zij zich en dit was dan meestal bij den bladtop. Ik schrijf dit toe aan de omstandigheid, dat aan den eenigszins naar beneden gebogen bladtop water blijft hangen, zoodat daar ter plaatse de ontwikkeling der zwam begunstigd wordt. Deze planten brachten het er veel beter af dan die, welke met de sporen van de micro-vormen bespoten waren. De bladeren, met den macro-vorm bespoten, hadden niet veel van deze aantasting, die spoedig tot staan kwam, te lijden. Er konden zich nieuwe, jonge blaadjes ontwikkelen, zoodat de planten er weer gezond gingen uitzien. Door de bespuiting met pycnosporen was natuurlijk ook de grond geïnfecteerd, zoodat het niet te verwonderen was, dat ook de knol en de wortels ziekteverschijnselen gingen vertoonen, waaraan tenslotte vele planten te gronde gingen.

De resultaten van deze infectieproeven met sporen van den ma-

cro-vorm komen geheel overeen met de resultaten van KLEBAHN en ik kan, voor zoover de macro-vormen betreft, zijn conclusie bevestigen, dat het blad zelfs in vochtige omgeving geen gunstig substraat is voor *Phoma apiicola*. Anders is het gesteld met de micro-vormen; uit mijn infectieproeven blijkt duidelijk, dat deze, althans in vochtige omgeving, als ernstige bladparasieten kunnen optreden.

Her-isolatie der vier vormen. Van de bladeren van elk der vier geïsoleerde groepen planten werden pycniden afgezonderd en in petrischalen uitgezaaid; alle vier de zwamvormen werden op deze wijze opnieuw geïsoleerd.

3. *De aantasting van planten in verschillende groeistadia in besmetten grond.*

In verband met de wijze van bestrijding is het van belang na te gaan of een infectie van besmetten grond uit mogelijk is en of de planten in verschillende groeistadia vatbaar zijn. In de praktijk zijn er aanwijzingen voor te vinden, dat jonge plantjes reeds op 't zaadbed aangetast worden; daarmede zouden de ziektekiemen overgebracht kunnen worden naar velden, die tot dusverre vrij van de ziekte geweest zijn.

Zooals reeds gezegd werd, is PETHYBRIDGE van meening, dat *Phoma apiicola* KLEBAHN in Engeland op kiemplantjes, die van „damping off" te lijden hadden, is aangetroffen. Dit moge waarschijnlijk zijn, zekerheid of het inderdaad de bedoelde zwam geweest is, heeft men niet.

KLEBAHN infecteerde kiemplantjes en grootere planten met „konidienhaltiges Wasser", dat hij verkregen had door stukjes van de oppervlakte van zieke knollen in water te laten liggen of door zulke stukjes in water fijn te wrijven en de vloeistof door een zeef te filtreeren. Een reincultuur krijgt men op deze wijze niet en men zou dan ook uit deze proef omtrent de oorzaak der ziekte niets geleerd hebben, ware het niet, dat hij er in geslaagd is ook door middel van een reincultuur enkele planten schurftziek te maken, Toch is ook deze laatste proef van KLEBAHN niet geheel bewijzend, omdat uit zijn verhandeling niet blijkt of de voor de proef gebezigde planten ziektevrij waren gekweekt.

In het hier volgende onderzoek werd nagegaan in welke mate planten van verschillende ontwikkeling aangetast worden in grond, die met *Phoma apiicola* KLEBAHN *macro-forma* besmet is. Ook werd nagegaan of kiemplantjes ziek worden in grond, die

besmet is met den micro-vorm. De hiervoor benoodigde reincultures waren gegroeid op gesteriliseerde rijst, een zeer goede voedingsbodem, die zich gemakkelijk door den grond laat mengen.

a. Infectie van kiemende zaden. Er werden vier potten gevuld met grond, die door koken gedeeltelijk gesteriliseerd was. Hierdoor worden wel niet alle micro-organismen gedood, maar pathogene organismen zijn, voor zoover bekend, tegen deze temperatuur niet bestand. Een van deze potten werd geïnfecteerd met een reincultuur van den Venloschen macro-vorm, de andere met een reincultuur van den Venloschen micro-vorm, de derde met deze beide cultures te samen, terwijl de vierde pot niet geïnfecteerd werd en als contrôle dienst deed. Drie weken nadat de grond besmet was, werd er met formaline ontsmet knolselderijzaad in gezaaid. Over elk der vier potten werd een glazen klok geplaatst, zoodat hieronder een vochtige atmospheer heerschte. De grondtemperatuur werd gedurende dit onderzoek op 17° gehouden.

Vrij spoedig kwamen de witte worteltjes uit het zaad te voorschijn om zich vervolgens naar den grond te richten en daarin door te dringen. Een groot deel der ontkiemde zaadjes bracht het echter niet zoover: zij werden blijkbaar direkt, wanneer ze uit het zaad te voorschijn kwamen, door de schimmel aangetast. Er trad althans een bruine verkleuring op en het kiemworteltje rotte geheel weg, zoodat van deze zaadjes niets terecht kwam.

Andere kiemworteltjes konden tot een zekere diepte in den grond doordringen, doch stierven dan af. In sommige gevallen lag een deel van den kiemwortel boven den grond. Dikwijls bleef dat deel gezond en dan werden hieruit nieuwe zijwortels gevormd, doch zoodra deze den grond bereikten, werden ook zij aangetast, en het plantje ging te gronde.

Tenslotte waren er ook kiemplantjes, die minder hinder van de zwam schenen te hebben, ze konden het althans zoover brengen, dat de kiemlobben zich ontplooiden. Na korteren of langeren tijd zag men echter aan het stengeltje bij de grond-oppervlakte een rotting optreden, waardoor het plantje omviel of bij de geringste aanraking afbrak. Dit verschijnsel komt geheel overeen met het ziektebeeld, dat bij bietenplantjes door *Phoma betae* Frank veroorzaakt wordt. In alle drie de geïnfecteerde potten trad precies hetzelfde ziekteverschijnsel op, terwijl de plantjes in den contrôlepot gezond bleven.

Door enkele der zieke plantjes uit te leggen op een agarvoedingsbodem werden de gebruikte zwamvormen teruggeïsoleerd. Hiermede is bewezen, dat *Phoma apiicola* Klebahn als

macro-vorm en micro-vorm in de kiembedden schadelijk kan optreden; de ziekteverschijnselen komen overeen met hetgeen men in de praktijk „'t smeul" noemt.

Hiermede is niet gezegd, dat niet ook andere zwammen 't smeul kunnen veroorzaken. Wel zal m.i. de zwam in de praktijk niet zoo schadelijk optreden als in de beschreven proeven; de schimmel toch had in den opzettelijk besmetten grond vrijwel de alleenheerschappij, terwijl in natuurlijken grond meer organismen aanwezig zijn, die een vrije ontwikkeling der Phoma zullen stuiten.

b. Infectie van verder ontwikkelde jonge planten. De gezonde jonge plantjes in den contrôlepot werden nu wat uitgedund, daardoor kregen de overblijvende meer ruimte voor verdere ontwikkeling. Nadat deze een twee- of drietal loofblaadjes gekregen hadden, werden tien van deze plantjes overgebracht in den pot, die geïnfecteerd was met den Venloschen macro-vorm. Over deze planten werd thans geen glazen klok geplaatst. De grondtemperatuur werd op 17° C. gehouden. De groei was gedurende de volgende weken in dezen pot en den bijbehoorenden niet-geïnfecteerden contrôlepot oogenschijnlijk voorspoedig; er was geen verschil te zien tusschen de planten in den geïnfecteerden pot en die in den contrôlepot. Na drie weken hadden deze planten een vier- of vijftal blaadjes ontwikkeld, die er gezond uitzagen. Zeer voorzichtig werden toen de planten uit den grond genomen en de wortels in water afgespoeld. Nu trad de ziekte duidelijk aan 't licht. De wortels van alle planten uit de geïnfecteerde potten waren aangetast en bij nauwkeurig toezien bleek, dat ook sommige bladstelen aan den voet wat bruin gekleurd waren; enkele lieten op deze plaats gemakkelijk van de plant los. Alle bijwortels, die rondom het jonge knolletje ontstaan waren, vertoonden bij de inplantingsplaats een gele vlek; ze lieten daar gemakkelijk los. Enkele dezer wortels waren geheel bruin. Ook zeer vele zijtakken der lagere wortels hadden bij de inplantingsplaats een gele vlek. Het viel mij op, dat die gele vlekken in hoofdzaak optraden bij de inplantingsplaats van een bijwortel aan den knol of van een zijwortel aan den hoofdwortel. Op die plaats tast de schimmel de wortels het eerst aan, terwijl de rest van den wortel langer weerstand biedt. Dat ook de bladstelen aan de inplantingsplaats het eerst aangetast worden is te verklaren door de omstandigheid, dat meestal alleen dit deel van het blad met besmetten grond in aanraking komt. Dat bij- en zijwortels bij hun aanhechtingsplaats het meest vatbaar zijn komt bij aantasting van planten door andere parasieten ook voor, zoo b.v. bij infectie van tabak door *Thielavia basicola* Zopf.. Of de door Conant (1927)

hiervan op grond van histologisch onderzoek gegeven verklaring ook voor de selderijziekte geldt, is niet nader onderzocht.

De meening van sommige kweekers „dat een roodbruine verklaring der ‚haarwortels' het eerste kenmerk der ziekte is" (QUANJER en SLAGTER, 1914, pag. 17) blijkt dus juist te zijn.

c. Infectie van halfvolwassen planten. Tenslotte werd nagegaan of planten in een nog verder gevorderd ontwikkelingsstadium voor de aantasting vatbaar zijn. Daartoe werden in de maand Juli buiten in een bak met natuurlijken (niet gestoomden) grond, waarin een mengsel van den Venloschen micro-vorm en macro-vorm aanwezig was, planten met half volwassen knollen gepoot, die tot dien tijd in gestoomden grond opgegroeid waren. Eveneens werden 12 planten met half volwassen knollen gepoot in grond, waarin een mengsel van den Maastrichtschen micro- en macro-vorm aanwezig was. In een kleineren, niet geïnfecteerden bak, die als contrôle diende, werden nog 6 dezer planten met half volwassen knollen gepoot. De bakken werden niet met een glasruit overdekt, zoodat deze planten onder geheel natuurlijke omstandigheden groeiden.

Gedurende den loop der volgende maanden kon reeds geconstateerd worden, dat er aantasting plaats vond aan den voet van de bladstelen der in besmetten grond groeiende planten. Na verloop van twee maanden lagen vele der oudste bladeren ten gevolge van de ziekte op den grond. In de maand November werden alle knollen gerooid, de planten hadden zich, ofschoon ze niet vrij van ziekte waren, goed ontwikkeld; afgezien van de oudste, waren de bladeren geheel gezond; ook de knollen hadden zich flink ontwikkeld. Aan den hals van den knol was echter de aantasting zeer goed waarneembaar. De oppervlakte was daar typisch „schurftig". De wortels waren goed ontwikkeld en in mindere mate aangetast dan men dat zou verwachten; wel traden talrijke gele vlekken op, maar het wortelsysteem als geheel was nog in een goede conditie. Deze verschijnselen waren in beide geïnfecteerde bakken precies gelijk; de knollen in den contrôle-bak waren geheel gezond gebleven.

Op de zieke knolgedeelten en op den voet der bladstelen werden pycniden aangetroffen. Door uitzaaiing der pycnosporen werden de macro- en de micro-vorm zoowel van de Maastrichtsche als van de Venlosche zwam weer terug geïsoleerd.

Uit de voorgaande proeven blijkt duidelijk, dat de zwam van den grond uit de planten kan aantasten.

Kiemplantjes hebben er het meest van te lijden; bij uitzaaien op sterk besmetten grond moet de praktijk den indruk krijgen, dat het zaad weinig kiemkrachtig is.

Iets oudere plantjes worden eveneens zeer sterk beschadigd; het ziekteproces ontwikkelt zich alleen wat langzamer. Het is niet aan twijfel onderhevig, dat de ziekte met aangetaste „zetplanten" kan worden overgebracht naar het vrije veld. Wanneer de omstandigheden voor de zwam gunstig zijn, zullen dergelijke vroegtijdig aangetaste planten bij den oogst knollen leveren, die de ziekte in de ergste mate vertoonen. Met eenige zorg kunnen de telers vermijden, dat hun aantal te groot wordt.

Half volwassen planten kunnen op het veld aangetast worden, ofschoon zij in dat geval veel minder van de ziekte te lijden hebben. De aantasting zal bij deze planten beperkt blijven tot den hals van den knol en tot de hoogere wortels. De mate van aantasting zal echter in al deze gevallen afhankelijk zijn van de weersomstandigheden gedurende het groeiseizoen. Zooals wij in 't voorgaande reeds meermalen de gelegenheid hadden te zien, is groote vochtigheid bevorderlijk voor de ontwikkeling der ziekte.

HOOFDSTUK IV.

DE VATBAARHEID VAN KNOLSELDERIJ-VARIËTEITEN.

Van een twintigtal knolselderij-variëteiten, waarvan het zaad betrokken was uit Duitschland, Engeland, Frankrijk en Holland werden telkens 35 jonge planten bespoten met sporen van den Venloschen micro-vorm; en een evengroote partij planten met sporen van den Maastrichtschen micro-vorm. Dit was oorspronkelijk gedaan om na te gaan of er een verschil in pathogeen karakter tusschen deze twee zwamrassen zou bestaan. De beide groepen planten groeiden in broeibakken, waar een vochtige atmospheer heerschte. Onder deze omstandigheden was er geen verschil in aantasting daar de twee zwamrassen te constateeren. Over het algemeen was er ook geen groot verschil in vatbaarheid te zien tusschen de selderijvariëteiten. Alleen de variëteiten no. 10 en 18 hadden in beide gevallen minder van de aantasting te lijden. Deze twee variëteiten munten uit door een forschen groei. Tot dezelfde conclusie kwam ik naar aanleiding van een spontane infectie, die op een proefveld optrad, waar deze twee variëteiten naast de andere aanwezig waren.

Ook de, in de inleiding vermelde, voorloopige waarneming, die leerde, dat door verhooging der temperatuur de aantasting bij de variëteit no. 18 in sterkere mate kan teruggedrongen worden dan bij no. 20, een Venlosche variëteit met minder forschen groei, wijst op een grootere resistentie van variëteit no. 18.

Bennett (1921) vergeleek de vatbaarheid van verschillende Amerikaansche selderij-variëteiten. Ook hij kwam tot de conclusie dat, geen enkele variëteit onvatbaar is maar dat de forsche groeiers het minst aan deze ziekte onderhevig zijn.

De bij dit onderzoek beproefde knolselderij-variëteiten zijn de volgende:

1. Céleri rave de Paris amélioré;
2. C. r. maraîcher;
3. C. r. géant;
4. C. r. très hâtif d'Août;
5. C. r. pomme à petite feuille;
6. C. r. rond hâtif;
7. Turnip-rooted celery;
8. Sellerie Hamburger;
9. S. non plus ultra;
10. S. Riesen Alabaster;
11. S. Schneeball;
12. S. Naumberger Riesen;
13. S. Delikatesse;
14. Knolselderij Erfurter;
15. Kn. Prager reuzen;
16. Kn. gewone groote;
17. Kn. Westlandsche Prager reuzen;
18. Kn. Venlosche var.;
19. Kn. Maastrichtsche var.;
20. Kn. Venlosche var.

HOOFDSTUK V.

PHOMA APIICOLA KLEBAHN EN PHYLLOSTICTA APII HALSTED.

1. *Het voorkomen van Phoma apiicola Klebahn op de bovengrondsche deelen der plant.*

a. op het blad.

BENNETT (1922, pag. 9) zegt omtrent het voorkomen der zwam op de bladeren en het zaad: „Under Michigan conditions natural infection of the leaves has not been noted, and if it does take place it is probably of rare occurrence. Wherever the disease has appeared in America it seems to have been restricted to underground parts." Even later vermeldt hij: „In Holland, Klebahn found the disease on celeriac leaves and on the flowering parts, and also discovered pycnidia of the pathogen on the seeds."

Men zou daaruit kunnen opmaken, dat, volgens KLEBAHN's onderzoek, de zwam op het blad en op het zaad in Holland eenigszins regelmatig zou voorkomen. Afgezien van het feit, dat KLEBAHN zijn waarnemingen niet in Holland doch in Duitschland verrichtte, laat zijn onderzoek een dergelijke conclusie niet toe. Wel zegt KLEBAHN op pag. 24 van zijn plublicatie: „Sodann fand ich Pycniden von völlig demselben Aussehen vereinzelt auf den Früchten. Endlich kommen sie gelegentlich auch auf dem Laub vor," hij laat daar echter op volgen „doch scheint mir ihr Auftreten hier immer ein Ausnahmsweise zu sein." Zijn meening, dat de zwam een enkele maal op het blad voorkomt, steunt daarenboven op zijn infectieproeven onder glasklokken, vermeld op pag. 35. „Wiederholt habe ich versucht den Pilz auf die Blätter zu übertragen. In Wasser verteilte Konidien wurden über die Blätter verstäubt und die Pflanzen dann unter Glocken gehalten. Der Erfolg war das Auftreten ziemlich zahlreicher brauner Flecken auf den Blättern, doch wurde nur ein einziges Mal eine Pycnide auf einen solchen Flecken gefunden."

BENNETT vond, dat voor het ontkiemen der sporen een groote vochtigheid vereischt wordt. BENNETT beschouwt dit als de reden waarom de bladeren in de open lucht niet aangetast worden. Wanneer dit zoo is, kunnen infecties onder glasklokken niet als bewijs dienen voor aantastbaarheid in de open ucht, waar de vochtigheid minder groot is dan onder glas-

klokken en waar de planten door den wind spoedig opdrogen. De infectieproeven, die door mij uitgevoerd werden zonder glasklokken, gelukten dan ook niet, niettegenstaande de bladeren herhaaldelijk met water waren begoten en de planten in een kas stonden. Zelfs gelukten deze infecties niet met den micro-vorm, die de planten onder de glasklokken geheel deed afsterven. Des te minder zal de macro-vorm de bladeren in de open lucht aantasten, daar hij zelfs onder de glasklokken dit in zeer geringe mate doet. (Plaat XVIII fig. 8). De meening van KLEBAHN „dasz die Blätter kein geeignetes Substrat für den Pilz sind" (althans voor den macro-vorm) wordt hierdoor bevestigd.

In den herfst van 1926 onderzocht ik verschillende knolselderijvelden en ging ik na in welke mate *Phoma apiicola* KLEBAHN onder de hier heerschende weersomstandigheden op de bladeren voorkomt. Het genoemde jaar was blijkbaar gunstig voor het parasitisch optreden der zwam; de ziekte was toen zeer algemeen; zoo waren de aan de veiling te Venlo aangevoerde knollen voor een zeer groot percentage schurftziek. Onder dergelijke omstandigheden zou men ook aantasting van het loof kunnen verwachten. Het zoeken naar de door Phoma veroorzaakte bladvlekken werd mij vergemakkelijkt, doordat mij het beeld van de aantasting uit de resultaten mijner kunstmatige infecties onder glasklokken bekend was.

Bijna alle bladeren der velden, die ik bezocht, waren meer of minder ernstig aangetast door *Septoria apii*; de daardoor veroorzaakte bladvlekkenziekte werd meestal als zoodanig op 't oog herkend. In gevallen waar twijfel bestond, werden de bladeren mee naar het laboratorium genomen en de aanwezige vruchtlichamen microscopisch onderzocht. Phoma-pycniden werden niet gevonden.

Rekening houdend met de omstandigheid, dat deze zwam het best gedijt in een vochtige omgeving, stelde ik in den herfst van 1926 op een proefveld in den Eng te Wageningen een nader onderzoek in en lette daarbij speciaal op de bladeren , die geknakt waren of om een of andere reden met hun bladschijf op den grond waren terecht gekomen. Op dit proefveld waren verschillende variëteiten knolselderij aanwezig, die zich in groeiwijze van elkaar onderscheidden; sommige spreidden hun bladeren eenigszins vlak over den grond uit; andere lieten ze meer in de hoogte groeien. Alle variëteiten waren door de schurftzwam aangetast, de meeste ernstig. Zooals hiervoor in hoofdstuk I, § 3, is vermeld, vallen door deze aantasting de oudste bladeren om en komen dientengevolge op den grond terecht.

Het gelukte mij nu op de bladschijf dezer bladeren verscheidene typische sectoraalsgewijze gele verkleuringen te vinden, die mij deden denken aan de vlekken, die ik verkreeg door de kunstmatige infectie met den macro-vorm van *Phoma apiicola*. Op de meeste dezer vlekken waren echter met behulp van het binoculair-microscoop, geen pycniden te vinden. Na eenig zoeken gelukte het mij toch een blad te vinden, waarop tien tot vijftien Phoma-pycniden aanwezig waren; later vond ik nog een tweede blad met acht dergelijke pycniden. Enkele daarvan werden afgezonderd en een pycnosporen-suspensie werd uitgezaaid op selderijagar. De kolonies, die hieruit ontstonden, leken in vele opzichten op die van den macro-vorm. Planten, die met mycelium geïnfecteerd werden, vertoonden dergelijke ziekteverschijnselen als veroorzaakt worden door *Phoma apiicola*. Deze op het blad gevonden zwam vormde met een der micro-vormen „conjunctpycniden" (zie voor de beteekenis hiervan Deel II Hoofdstuk III). Ofschoon men op dergelijke, slechts gedurende één jaar verkregen uitkomsten, niet met volle zekerheid kan beslissen, geloof ik toch wel, mede naar aanleiding van hetgeen hiervoor reeds gezegd is over de eigenschappen der zwam en de verrichte infectieproeven, te kunnen aannemen, dat *Phoma apiicola* KLEBAHN onder de hier heerschende weersomstandigheden niet als bladparasiet optreedt. In het hierboven aangehaalde geval, waarin enkele pycniden gevonden werden op bladeren, die op den grond terecht gekomen zijn, kan men moeilijk het bewijs vinden, dat deze Phoma als bladparasiet te beschouwen is: deze bladeren toch zijn bijna afgestorven en vallen reeds aan saprophyten ten prooi.

b. op het zaad.

Wat betreft het voorkomen van deze parasitaire zwam op het zaad, komen niet alle onderzoekers tot dezelfde uitkomsten. KLEBAHN, (1910), die de ziekte het eerst nauwkeurig onderzocht, deelt mee, dat hij *Phoma*-achtige pycniden op het zaad heeft aangetroffen; het gelukte hem echter niet de sporen tot ontkieming te brengen. Hij zaaide verder in gesteriliseerden grond *niet* ontsmet zaad, dat afkomstig was van een veld, waar de ziekte in sterke mate was opgetreden. In een der twee zaaibakken vond hij nadien op één blaadje één Phoma-achtige pycnide. Deze pycnide had hetzelfde uiterlijk als die van *Phoma-apiicola*. KLEBAHN besluit, mede naar aanleiding van enkele aanwijzingen uit de praktijk, dat deze ziekte waarschijnlijk met het zaad overgaat.

Dat het echter vaak moeilijk is om uit dergelijke aanwijzingen een juiste conclusie te trekken, bleek mij uit waarnemingen

op een proefveld in den Eng te Wageningen. Van een twintigtal knolselderij-variëteiten, waarvan het zaad ontsmet was en de jonge plantjes gegroeid waren in gestoomden grond, werden telkens 25 planten uitgepoot op een drietal veldjes van bovengenoemd proefveld. De oorspronkelijke bedoeling was den invloed van een bepaalde bemesting op de opbrengst der planten en tevens de groeiwijze der verschillende variëteiten na te gaan. Ofschoon de bemestingsproef niet tot resultaten leidde, was deze aanplanting toch van belang toen in den zomer alle variëteiten op de drie veldjes vrij ernstig schurftziek bleken te zijn, zoodat mij nu een welkome gelegenheid geboden werd om de resultaten der proeven over vatbaarheid door middel van kunstmatige infectie op het vrije veld aan volwassen planten te controleeren. Het eigenaardige was echter, dat planten aangetast werden door een parasiet, dien men geenszins in dezen grond zou verwachten. De voorvruchten in de twee voorafgaande jaren waren granen en aardappelen geweest, terwijl het jaar voordien het stuk grond braak gelegen had. Selderij is overigens een gewas, dat in deze omgeving niet verbouwd wordt, peen slechts zeer zelden. Waar men hier dus geenszins kon vermoeden, dat de infectie van den grond was uitgegaan, zou men in een dergelijk geval al zeer sterk geneigd zijn de herkomst der ziekte te zoeken in het zaad. Dat dit geen bron van infectie was, blijkt afdoende uit het feit, dat het zaad ontsmet was en dat de planten, die als contrôle dienden bij andere proeven en van hetzelfde zaaisel afkomstig waren, alle gezond bleven. Er blijft daarom niets anders over dan aan te nemen, dat de aantasting van den bodem is uitgegaan. Vermoedelijk spelen bepaalde gewassen of onkruiden een rol bij het in stand houden van den parasiet op den akker.

Quanjer en Slagter (1914) onderzochten verschillende zaadmonsters zonder dat het hun gelukte *Phoma apiicola* op het zaad te vinden.

Bennett (1922) onderzocht vele buitenlandsche zaadmonsters afkomstig uit Engeland, Frankrijk en Holland, ook hij kon den ziekte-verwekker niet op het zaad aantreffen.

In een tabel vermeldt Dorogin (1923) de voornaamste parasitaire schimmels, die op onderzochte zaadmonsters zijn gevonden. *Phoma apiicola* staat *niet* vermeld bij de schimmels, die op selderijzaad werden aangetroffen.

Volgens welwillende mededeeling van mej. Dr. L. C. Doyer, mycologe aan het proefstation voor Zaadcontrôle te Wageningen, worden nu en dan op enkele selderij-zaadmonsters Phoma-achtige pycniden gevonden, die veel lijken op de pycniden van *Phoma*

apiicola KLEBAHN. Door hare bemiddeling werden mij eenige dergelijke zaadmonsters verstrekt. [1])

De Phoma-achtige pycniden, die ik op verschillende dezer zaden zag, waren geel van kleur en hadden een donkeren mond, de diameter dezer pycniden varieerde van 90 tot 200 μ (15 metingen), zoodat deze inderdaad geheel geleken op de pycniden, welke men aantreft op schurftzieke selderijplanten. Deze pycniden zag ik het meest op het zaad nadat het 10—15 dagen op vochtig filtreer papier gelegen had bij een temperatuur van ongeveer 15° C.

Sporen-suspensies, van verschillende zaadmonsters afkomstig, werden uitgezaaid in selderij-agar. In de meeste gevallen ontkiemden de sporen en ontstond daaruit een aanvankelijk witte schimmel, die na eenigen tijd zwart werd. Uit microscopisch onderzoek bleek, dat deze zwam vele zwarte chlamydosporen gevormd had, die bij de andere door mij onderzochte Phoma-rassen nooit zijn aangetroffen. Vrij spoedig ontstonden in de reincultures pycniden, die overeen kwamen met die, welke op het zaad aanwezig waren. Jonge selderijplanten, die met deze zwam geïnfecteerd werden, bleven volkomen gezond.

Was het hierdoor reeds bewezen, dat de van het zaad geïsoleerde zwam niet dezelfde was als *Phoma apiicola*, ten overvloede bleek dit uit de meting der pycnosporen, die direct van het zaad geïsoleerd waren. De sporen zijn gemeten in een 10 % gelatineoplossing en na kleuring met Gentiaan violet. De lengte der sporen varieert van 3,99—5,72 μ (100 metingen); zij zijn dus aanmerkelijk grooter dan die van *Phoma apiicola* KLEBAHN. De in reincultuur ontstane pycnosporen der van het zaad geïsoleerde zwam hadden dezelfde variatiebreedte nl. 3,64—5,72 μ (25 metingen). Hiermede is bewezen, dat op het selderij-zaad een Phoma voorkomt, waarvan de pycniden zeer veel gelijken op die van *Phoma apiicola* maar die daarmee niet identiek zijn; deze twee zwammen verschillen in grootte der conidiën, verder daarin, dat de eerste wel en de tweede niet chlamydosporen vormt, en ten slotte daarin, dat de eerste wel en de tweede niet pathogeen is voor selderijplanten.

Door een voortgezet onderzoek gelukte het mij ten slotte van een zaadje een pycnide te isoleeren uit welker sporen bij uitzaaiing een witte (later grijsgroene) zwam ontstond, die geen donkere

[1]) Het hier volgende deel van dit onderzoek werd uitgevoerd in het Proefstation voor Zaadcontrôle te Wageningen. Ik betuig gaarne mijn oprechten dank aan den Directeur Dr. W. J. FRANCK, dat hij mij daartoe in de gelegenheid stelde, en aan Dr. L. C. DOYER voor de mij verstrekte aanwijzingen.

chlamydosporen vormde doch waarvan het uiterlijk mij deed denken aan de vroeger door mij geïsoleerde Phoma apiicola. Overgeënt op steriele selderij-stelen vormde de zwam pycniden, waarvan het uiterlijk en de grootte overeenkwamen met die van Phoma apiicola. Ook de afmetingen der gevormde sporen waren dezelfde als gevonden waren voor die der schurftzwam. Planten, die met deze pycnosporen geïnfecteerd werden, vertoonden spoedig aan den voet der bladstelen de ziekteverschijnselen, die ook *Phoma apiicola* teweegbrengt. Het staat dan ook buiten twijfel vast, dat deze van het zaad geïsoleerde zwam identiek is met *Phoma apiicola* KLEBAHN.

KLEBAHN heeft eenmaal een Phoma-achtige pycnide op het zaad gevonden, doch daar het mij bleek, dat op het zaad meermalen pycniden te vinden zijn, die zeer veel op die der schurftzwam gelijken, doch er niet identiek mee zijn, is het zeer de vraag of dat werkelijk *Phoma apiicola* geweest is.

Uit het onderzoek van het zaad kan de eindconclusie getrokken worden, dat het slechts bij zeer hooge uitzondering een rol bij de verbreiding der ziekte kan spelen.

2. *De kwestie der identiteit van Phoma apiicola* KLEBAHN *en Phyllosticta apii* HALSTED.

In de systematiek der *Fungi Imperfecti* is men gewoon onderscheid te maken tusschen het geslacht Phoma, dat op onderaardsche plantendeelen en stengels leeft, en het geslacht Phyllosticta, dat op bladeren voorkomt, zonder dat daarbij typische morphologische verschillen tusschen deze beide geslachten worden aangegeven. Uit nadere onderzoekingen is gebleken, dat een dergelijke indeeling willekeurig en daardoor niet vol te houden is. Zoo vond HEDGCOCK (1904), dat de op biet voorkomende *Phyllosticta betae* en *Phoma betae* identiek zijn, hetgeen later door KALISVAART in het laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek te Wageningen bevestigd werd (niet gepubliceerd). Zooals in het voorgaande gebleken is, zal *Phoma apiicola* KLEBAHN onder de hier heerschende omstandigheden als regel niet op het blad voorkomen. Er is mij dan ook in de Europeesche literatuur geen enkele opgave bekend geworden, waarin sprake is van een selderij-bladziekte, die veroorzaakt wordt door een Phoma of Phyllosticta. In Amerika heeft HALSTED gewag gemaakt van een Phyllosticta, die op het blad sectoriale gele vlekken teweegbrengt; op den rand waarvan pycniden ontstaan. In reincultuur vormt deze zwam op gesteriliseerde selderij-bladstelen en in de vloeistof beneden in de cultuurbuizen reeds na 5 dagen pycniden. Deze

zwam wordt aangeduid met den naam *Phyllosticta apii*, HALSTED. Omtrent aard en grootte der pycniden en sporen is niets bekend. In het Bureau of Plant Industry te Washington worden geen reincultures of herbarium materiaal dezer ziekte bewaard. Prof. Dr. H. H. WHETZEL (Cornell University Ithaca, N. Y.) deelde mij welwillend mee, dat deze Phyllosticta ziekte in den Staat New York niet bekend is, niettegenstaande in het veld-laboratorium te Williamson onderzoekingen over selderijziekten verricht zijn. Ook in de literatuur is er niets meer over gepubliceerd. Het was mij daardoor onmogelijk de door mij geïsoleerde Phoma-vormen te vergelijken met de Amerikaansche *Phyllosticta apii*.

In zijn onderzoek ging KLEBAHN na of de door hem als oorzaak der „Schorfkrankheit" gevonden zwam dezelfde was, als de door HALSTED gevonden *Phyllosticta apii*. Bij zijn infectieproeven vond KLEBAHN, dat de zwam der schurftziekte zelfs onder gunstige omstandigheden op bladeren moeilijk gedijt, terwijl zij in reincultures in het algemeen, voor zoover KLEBAHN bekend was, slechts zeer langzaam pycniden vormt.

Ofschoon er niet veel gegevens bekend zijn omtrent *Phyllosticta apii*, meent KLEBAHN toch met voldoende zekerheid te kunnen aannemen, dat de door hem gevonden zwam niet dezelfde is als de door HALSTED bedoelde, die in tegenstelling met de zwam der schurfziekte een bladparasiet is.

KLEBAHN beschouwt de door hem gevonden Phoma als een nieuwe soort, die hij *apiicola* noemt.

Vergelijken wij in dit verband de beide door mij geïsoleerde zwamvormen, dan blijkt uit de infectieproeven, dat de macro-vorm niet als een bladparasiet te beschouwen is en dat hij slechts op bepaalde voedingsbodems pycniden maakt. Wel bracht deze vorm het op gesteriliseerde selderij-bladstelen in 14 dagen tijds tot pycnide-vorming, zoodat in dit opzicht 't verschil tusschen den macro-vorm en de Phyllosticta geringer wordt. Toch meen ik uit het feit, dat Phyllosticta een bladparasiet is en de macro-vorm niet, te kunnen afleiden, dat deze twee zwammen niet identiek zijn, al behoeven ze daarom niet tot verschillende geslachten gerekend te worden.

De vergelijking tusschen den micro-vorm en *Phyllosticta apii* is nog moeilijker door te voeren. Blijkbaar verschillen ze zeer weinig van elkaar. Beide vormen ze in enkele dagen tijds op gesteriliseerde selderij-bladstelen vele pycniden, terwijl ook de micro-vorm, althans in een vochtige atmospheer, als bladparasiet kan optreden. Met eenige waarschijnlijkheid zou men daaruit kunnen besluiten, dat de micro-vorm dezelfde is als *Phyllosticta apii* HALSTED. In dat geval zou deze zwam niets anders zijn dan

een vorm, die zich uit *Phoma apiicola* KLEBAHN heeft afgesplitst. Men kan zich voorstellen, dat, onder bepaalde omstandigheden, b.v. ten gevolge van passage door een plant, dezelfde omzetting plaats heeft van den macro- in den micro-vorm, die ik in het laboratorium bij de cultuur op gesteriliseerde knolselderij heb leeren kennen; op deze kwestie kom ik evenwel in het mycologisch deel terug.

HOOFDSTUK VII.

BESTRIJDING.

Om ziektevrij plantgoed te verkrijgen is het gewenscht met behandeling van het zaaizaad te beginnen, al zal er in den regel niet veel kans bestaan, dat dit met de schurftzwam besmet is. Dit is te meer aan te raden omdat zeer vele zaadpartijen besmet zijn met *Septoria apii*, die door formaline, volgens QUANJER en SLAGTER, gedood wordt. De ontsmetting van het zaad kan, volgens het onderzoek van MULLER (1925), geschieden in een oplossing van 0,25 % formaldehyde, 0,25 % germisan of 0,25% uspulun gedurende 30 minuten.

Daar de parasiet zoo goed als uitsluitend tot den grond beperkt blijft en van hieruit de ondergrondsche plantendeelen aantast, zal de bestrijding zich vooral op een behandeling van den grond moeten richten.

In de eerste plaats komt daarvoor het zaaibed in aanmerking. In de broeibakken, waarin reeds vroeg in het voorjaar gezaaid wordt, heerscht meestal een eenigszins vochtige atmospheer, hetgeen een gunstige omstandigheid is voor de ontwikkeling der zwam; ook zijn jonge plantjes zeer vatbaar voor aantasting. Hetzelfde geldt voor den bak, waarin de plantjes later verspeend worden. Een infectie, die in een dezer bakken optreedt, verspreidt zich gemakkelijk over een groot aantal plantjes; ook bestaat er veel kans op een algemeene infectie bij het overbrengen van de planten naar het vrije veld, wanneer deze namelijk met hun wortels in een bakje met water geplaatst worden, om uitdroging te voorkomen.

Uit de proeven van QUANJER en SLAGTER (1914) bleek, dat met een ontsmetting van den grond door middel van formaline gunstige resultaten te verkrijgen zijn.

(Men begiet daartoe den grond met $\frac{1}{2}$ L. formaline, die met 6 L. warm water verdund is, per M². Gedurende 24 uur legt men er vochtige zakken overheen; daarna wacht men 10 dagen met zaaien om de schadelijke dampen te laten ontwijken).

Een dergelijke behandeling van de zaaibedden zal echter, vooral in streken waar de ziekte algemeen voorkomt, onvoldoende zijn daar ook oudere planten op het vrije veld aangetast kunnen worden. Een ontsmetting van den grond is hier niet uitvoerbaar doch ook minder noodzakelijk dan een ontsmetting van den

grond der zaaibakken. Op het vrije veld zullen de omstandigheden voor de zwam meestal niet zóó gunstig zijn als in de zaaibakken; een groote vochtigheid heerscht er in den regel niet gedurende langen tijd, terwijl de planten ouder zijn en dientengevolge minder van de zwam te lijden hebben.

Op het vrije veld moet men er zich wel toe beperken om de omstandigheden voor de plant zoo gunstig mogelijk en die voor de schimmel zoo ongunstig mogelijk te doen zijn. Naast een goede bemesting moet men daarom zorgen voor een doorlatenden grond en een goeden waterafvoer.

Het verdient verder overweging de jonge plantjes zoo laat mogelijk in het voorjaar uit te zetten, opdat ze zoo min mogelijk blootgesteld worden aan de ongunstige weersomstandigheden van het voorjaar, die hare ontwikkeling belemmeren. In streken waar de ziekte algemeen voorkomt verbouwe men snelgroeiende variëteiten.

Dat een voortgezet onderzoek over de vatbaarheid van selderijvariëteiten van groot belang voor de praktijk kan worden, werd in de inleiding reeds gezegd.

MYCOLOGISCH DEEL.

HOOFDSTUK I.

DE OVERGANG DER BEIDE ZWAMVORMEN IN ELKAAR.

1. *De afsplitsing van den micro- uit den macro-vorm.*

Uit de in het vorig deel beschreven infectieproeven bleek, dat twee zwamvormen de schurftziekte van de knolselderij kunnen veroorzaken. De macro-vorm komt overeen met de zwam, die vroegere onderzoekers reeds ontdekten als oorzaak der ziekte. In de literatuur was echter, afgezien van HALSTED's onvolledige mededeeling, niets bekend van een zwam van het type van den micro-vorm als oorzaak van een knolselderijziekte. Het lag dus voor de hand na te gaan, of de micro-vorm inderdaad op Phomazieke planten voorkomt en of hij tot bepaalde deelen daarvan beperkt blijft. Zooals in het voorgaande vermeld is, treft men pycniden aan op de bruine vlekken van den knol en eveneens op den voet van de buitenste in een krans geplaatste bladstelen. Het was mij opgevallen, dat de pycniden, die op den knol voorkomen, kleiner en donkerder van kleur zijn dan die, welke men op den voet van de bladstelen vindt; deze laatste zijn grooter en lichter van kleur. Een dergelijk verschil bestaat er tusschen de pycniden der beide zwamvormen. Er werden daarom op selderij-agar sporen van deze twee soorten pycniden afzonderlijk uitgezaaid. Van knollen uit Maastricht, Venlo en Wageningen werden 7 pycniden en hiervan 62 kolonies en van bladsteelvoeten van dezelfde herkomst werden 3 pycniden en hiervan 36 kolonies geïsoleerd. Spoedig bleek, dat geen enkele kolonie van den micro-vorm aanwezig was, ze behoorden alle tot den macro-vorm.

Uit vroegere onderzoekingen was gebleken, dat de micro-vorm bij een temperatuur van 24° C. niet op kers-agar groeit. Om na te gaan of wellicht in dit opzicht toch nog eenig verschil tusschen de geïsoleerde kolonies bestond, werden zij alle geënt in buizen met kers-agar en bij een constante temperatuur van 24° C. gezet. Alle kolonies groeiden echter uitstekend. De pycniden, die iets verschilden in uiterlijk en van twee verschillende plantendeelen afkomstig waren, zijn dus in werkelijkheid niets anders dan pycniden van den macro-vorm. Het eigenaardige feit, dat de micro-vorm in den herfst van 1926 van deze knollen niet werd geïsoleerd, terwijl hij zoowel in de Venlosche als in de Maas-

trichtsche cultures in het voorjaar van 1926 wel werd gevonden, zou op een van de drie volgende manieren kunnen worden verklaard:

1.° De micro-vorm komt betrekkelijk zelden op den knol of op den bladvoet voor; een tiental pycniden zou daarom een te gering aantal zijn om daaronder dezen vorm aan te treffen.

2o. De micro- en de macro-vorm hebben in de zieke plant ieder hun bepaald gebied, zij volgen elkander op in verschillende ziekte-stadia. De micro-vorm zou bv. meer binnen in den knol kunnen zitten, terwijl de macro-vorm meer buiten op het reeds door den micro-vorm aangetaste weefsel aanwezig zou kunnen zijn.

3°. De micro-vorm is als zoodanig niet van de plant te isoleeren, doch is als een „constante variatie" op een der gesteriliseerde voedingsbodems ontstaan.

Onderzoek naar aanleiding van de 1ste hypothese. Volgens de hiervoor beschreven methode waren slechts 10 pycniden en 98 kolonies nagegaan; terwijl volgens de nu te beschrijven methode een grooter aantal pycniden en kolonies in het onderzoek betrokken werd. Van de knollen afkomstig uit Maastricht werden 20 pycniden afgezonderd en deze te zamen in één steriele buis met een weinig gesteriliseerd water gebracht. Uit deze buis werden sporen in 10 petrischalen met selderij-agar uitgezaaid. Nadat deze sporen ontkiemd waren, werden telkens ongeveer 10 kolonies te zamen in één buis op gesteriliseerde knolselderij overgebracht. Er waren een twintigtal dergelijke cultuurbuizen aanwezig.

Op dezelfde manier werden twintig pycniden geïsoleerd van den verbreeden voet der stelen van Maastrichtsche knollen. Er waren dus veertig pycniden en circa 400 kolonies in het onderzoek betrokken. Was er nu in een dezer buizen een micro-vorm aanwezig, dan zou in die buis, in tegenstelling met de andere, spoedig pycnidevorming moeten optreden. Door zulk een vruchtlichaampje af te zonderen en de sporen ervan uit te zaaien, zou de micro-vorm gemakkelijk te isoleeren zijn. Iets dergelijks had echter niet plaats. In al de buizen was de groei precies gelijk; er ontstond zeer veel luchtmycelium; pycnide-vorming had voorloopig in geen der buizen plaats, na drie weken waren er nog geen aanwezig. Ook nu was blijkbaar alleen de macro-vorm geïsoleerd.

Onderzoek naar aanleiding van de 2de hypothese. Edson (1915) meent aangetoond te hebben, dat *Phoma betae*

Fr. in suikerbieten, die van de zgn. wortelbrand genezen zijn en uiterlijk niets meer van deze ziekte laten zien, toch nog inwendig aanwezig kan zijn, maar dan in een rusttoestand, die voor de plant op dat oogenblik niet schadelijk is. Hij meent verder, dat de zwam weer actief gaat worden, wanneer dergelijke van de ziekte herstelde bieten bewaard worden voor zaadwinning; in den winter zou de zwam weer in een schadelijken vorm overgaan. Het gelukte EDSON in genezen planten microscopisch een intracellulair mycelium aan te toonen. Terwijl in aan wortelbrand lijdende planten de wand en de kern der aangetaste cellen op een bepaalde manier reageeren op het binnendringen van het mycelium, zoodat men kan verwachten, dat ze spoedig zullen afsterven, schijnen de cellen van genezen planten geen hinder te hebben van de binnengedrongen zwam. Het mycelium in deze cellen is steeds onvertakt en heeft een ander voorkomen dan het mycelium in planten, die zichtbaar aan wortelbrand lijden.

EDSON vermeldt niet of hij deze zwam „apparently established in a condition of reduced virulence" als reincultuur geïsoleerd en daarmee infectieproeven verricht heeft, om aldus het bewijs te leveren, dat de door hem bedoelde zwamvorm werkelijk tot *Phoma betae* Fr. behoorde.

Naar aanleiding van EDSON's hypothese zou men zich kunnen voorstellen, dat de Phomazwam in een zieken selderijknol in twee vormen aanwezig is: in de nog pas aangetaste weefsels zou de zwam onder den invloed van nog gezonde cellen gedwongen zijn een bepaalden vorm aan te nemen en wel de micro-vorm, terwijl, wanneer de weerstand der cellen eenmaal gebroken is, er een overgang zou kunnen plaats hebben van den micro- in den macro-vorm. Zoo zou het te verklaren zijn, waarom door het uitzaaien der sporen van de pycniden, die aan de oppervlakte der zieke planten te vinden zijn, alleen de macro-vorm geïsoleerd kan worden, terwijl door het kweeken van den parasiet uit de dieper liggende, nog meer gezonde weefsels de micro-vorm te voorschijn kan komen.

Om dit nader na te gaan werden knollen onderzocht, die begin October 1926 van het proefveld gerooid en tot in Januari 1927 in een vorstvrijen kelder bewaard waren. Deze knollen vertoonden de ziekte in slechts zeer geringe mate, het waren de beste knollen van het proefveld, dat over 't algemeen ernstig door de ziekte was aangetast.

Met een steriel mes werden kleine stukjes uit den knol gesneden en uitgelegd in petrischalen met selderij-agar. In zeer veel gevallen kwamen bacteriën te voorschijn, doch ook *Phoma apiicola* als macro-vorm.

Er werden meerdere knollen op deze wijze onderzocht; in geen enkel geval kon een zwam, die op den micro-vorm geleek, geïsoleerd worden. Het lijkt me daarom niet aannemelijk, dat de micro-vorm als zoodanig in den knol aanwezig is.

Onderzoek naar aanleiding van de 3de hypothese. De micro-vorm was in 't voorjaar van 1926 't eerst opgemerkt in cultures ontstaan uit pycnosporen, die zich ontwikkeld hadden op gesteriliseerde knolselderij. Om te onderzoeken of het ontstaan van den micro-vorm afhankelijk is van de cultuur op dezen voedingsbodem werden de volgende isolaties en entingen uitgevoerd. Er werden in 1926 opnieuw éénspore cultures gekweekt uit pycnosporen, geïsoleerd van knollen afkomstig van Maastricht en Venlo. Mycelium van elk dezer éénspore-cultures werd geënt zoowel op gesteriliseerde knolselderij als op vloeipapier gedrenkt in Coons' oplossing.

Alle éénspore-cultures, zoowel Venlosche als Maastrichtsche, groeiden uitstekend op Coons' oplossing en vormden er spoedig pycniden op. Pycnosporen, die geïsoleerd waren van deze cultures werden uitgezaaid in schalen met selderij-agar. De kolonies, die in deze schalen ontstonden, waren alle duidelijk als de macrovorm te herkennen. Onder de éénspore-cultures was geen enkele micro-vorm als zoodanig aanwezig.

Op de gesteriliseerde knolstukjes had aanvankelijk een krachtige myceliumgroei plaats, zoodat de geheele buis er mee gevuld was. De eerste 3 weken werden geen pycniden gevonden. Toen de buizen anderhalve maand na de enting nauwkeurig gecontroleerd werden, waren in bijna alle buizen pycniden aanwezig.

De pycnosporen, die ontstaan waren op deze gesteriliseerde knolstukjes, werden op selderij-agar uitgezaaid. Na ontkieming zag men in al deze schalen naast den macro-vorm ook den micro-vorm te voorschijn komen. Hiermede was het bewijs geleverd, dat een éénspore-cultuur van den macro-vorm door pycnidevorming op gesteriliseerden knol een nieuwen zwamvorm, den micro-vorm, afsplitst. Dat we niet te maken hebben met twee verschillende rassen, die reeds in de levende knol aanwezig waren en hun aanwezigheid pas op den gesteriliseerden knol openbaren, volgt reeds uit het feit, dat ik uitging van éénspore-cultures.

Om dit echter nog op een andere manier te bewijzen, entte ik een kolonie van den macro-vorm, afkomstig van een spore ontstaan op gesteriliseerden knol, voor de tweede maal op dezen voedingsbodem. Was er sprake van twee rassen dan zou deze tweede passage nu uitsluitend den macro-vorm moeten opleveren. Dit was niet het geval, ook nu was na uitzaaiing der opnieuw ontstane

pycnosporen, zoowel de macro- als de micro-vorm aanwezig. Op de levende plant komt blijkbaar maar één *Phoma apiicola* voor, doch deze zwam splitst bij de vorming der pycniden op den gesteriliseerden knol telkens den micro-vorm af.

Bij de Venlosche cultuur had er op gesteriliseerde knolselderij behalve de bovengenoemde ook nog een tweede verandering plaats gehad. Door enting van den Venloschen macro- en micro-vorm op Coons' oplossing bleek, dat er van groei op dezen voedingsbodem thans geen sprake meer was. De beide Maastrichtsche vormen groeiden er uitstekend op. De resultaten, die ik het vorig jaar kreeg, worden hierdoor bevestigd en nader verklaard.

§ 2. *De overgang van den micro- in den macro-vorm.*

Dat het ontstaan van den macro-vorm uit den micro-vorm onder bepaalde omstandigheden mogelijk moet zijn was zeer waarschijnlijk, daar gebleken was, dat beide vormen constante variaties zijn van een en dezelfde zwam. Dat deze overgang inderdaad plaats heeft, bleek mij in den herfst 1926 uit de volgende waarnemingen.

In twee op een zuid-helling gelegen broeibakken was in het voorjaar van 1926 een partij jonge selderijplantjes (20 verschillende variëteiten) uitgeplant. De eene aldus beplante bak was bespoten met een sporensuspensie van den Venloschen micro-vorm, de andere op dezelfde wijze beplante bak was bespoten met een sporensuspensie van den Maastrichtschen micro-vorm.

Tusschen deze twee geïnfecteerde bakken lag een derde, kleinere bak, die wel beplant maar niet geïnfecteerd was en als contrôle dienst deed.

Van de geïnfecteerde planten werden zoowel de bladeren als de knolletjes en de wortels ziek. Deze planten werden verwijderd, zoodat slechts de besmette grond overbleef. In dezen grond werden in de maand Juni halfvolwassen knolselderijplanten, die tot dien tijd in steriele aarde gegroeid waren en die dan ook volkomen gezond bleken, uitgepoot. Na een maand vertoonden de planten in de bakken ,die door de Venlosche zwam geïnfecteerd waren, zoowel als die in de bakken, die door de Maastrichtsche zwam besmet waren, de ziekteverschijnselen duidelijk, terwijl de planten in den contrôle-bak daartusschen gezond gebleven waren.

In de maand November werden de knollen dezer drie bakken gerooid; die uit de geïnfecteerde bakken waren typisch schurftziek; de verschijnselen der ziekte, die door de Venlosche zwam waren teweeggebracht, kon men niet onderscheiden van die,

welke de Maastrichtsche zwam had veroorzaakt. De knollen uit den contrôle-bak waren gezond. Op de knollen en op de verbreede voeten der stelen van de zieke planten waren de pycniden gemakkelijk te vinden. Om na te gaan of het typisch verschil tusschen de Venlosche en Maastrichtsche cultuur ook nu nog aanwezig was, werden pycnosporen andermaal uitgezaaid op selderijagar. Tot mijn verwondering zag ik, dat verreweg de meeste kolonies, zoowel der Venlosche als der Maastrichtsche cultures zich ontwikkelden tot den macro-vorm, terwijl toch oorspronkelijk elk der beide bakken met den micro-vorm geïnfecteerd was. Ofschoon tengevolge van het open liggen dezer bakken gedurende meerdere maanden, een besmetting van buiten af heel goed denkbaar was, sprak toch reeds het uitblijven der ziekte in den contrôle-bak tegen deze mogelijkheid. Dat er inderdaad geen andere dan opzettelijke besmetting heeft plaats gehad, wordt bevestigd door de volgende waarnemingen:

Geen der kolonies van den macro- en micro-vorm, geïsoleerd uit den broeibak, die infecteerd was met den Venloschen microvorm groeiden op Coons' oplossing, terwijl de kolonies dezer beide vormen uit den broeibak, die geïnfecteerd was met den Maastrichtschen micro-vorm alle op deze oplossing groeiden. Daaruit volgt niet alleen, dat er geen besmetting was overgegaan van den eenen naar den anderen bak, hetgeen reeds bekend was uit het uitblijven van ziekte in den contrôle-bak, doch ook kan nu met zekerheid gezegd worden, dat er van buitenaf geen besmetting heeft plaats gehad. Het is duidelijk, dat elk der zwammen, de Venlosche zoowel als de Maastrichtsche, alleen aanwezig was in den broeibak, waarin zij opzettelijk was gebracht en bovendien is het volkomen zeker, dat er een verandering heeft plaats gehad van den micro- in den macro-vorm.

Bij mijn vroegere infectieproeven, waarbij planten direkt in aanraking werden gebracht met mycelium en sporen van de verschillende zwamvormen en waar een verblijf in den grond niet had plaats gehad, is een dergelijke verandering niet waargenomen; evenmin heb ik haar opgemerkt op de vele voedingsbodems, waarop ik de zwam in het laboratorium kweekte. Voor het tot standkomen der verandering van den micro- in den macrovorm schijnt het dus noodig te zijn, dat de zwam een tijdlang in den grond aan de natuurlijke afwisseling van temperatuur is blootgesteld. Om hierover meer te weten te komen, entte ik sporen van den Venloschen micro-vorm in een aantal cultuurbuizen, waarin een kleine hoeveelheid op drie achtereenvolgende dagen gesteriliseerden grond (een mengsel van klei, zand en turfmolm) gebracht was. Er vormde zich vrij spoedig bij een temperatuur

van 16°—21° C, een grijsgroen mycelium, doch het typische vlokkige mycelium van den macro-vorm was niet te zien.

Nadat de cultures op dezen grond ongeveer een maand gegroeid waren, vond ik door microscopisch onderzoek, dat hierin micro-pycniden gevormd werden. Ik entte mycelium dezer cultures op gesteriliseerde selderij-bladstelen. De algemeene habitus en de pycniden op de selderij-bladstelen geleken over 't algemeen zeer sterk op den habitus en de pycniden van den microvorm. De ontstane pycnosporen werden uitgezaaid op selderij-agar en honderd afzonderlijk liggende kolonies werden met behulp van het binoculair microscoop geïsoleerd. Na eenige dagen bleek, dat er van deze honderd éénspore-cultures slechts drie tot den macro-vorm behoorden.

Het blijkt dus, dat de verandering tijdens of na groei op gesteriliseerden grond tot stand gekomen was, ofschoon in geringe mate.

Naderhand werd gevonden, dat deze omzetting in veel sterkere mate plaats heeft, wanneer de pycniden van den micro-vorm zich ontwikkelen bij een betrekkelijk lage temperatuur, nl. 0—5° C.

De proef, waaruit dit bleek, werd aldus uitgevoerd.

Sporen van den Maastrichtschen micro-vorm werden geënt op selderij-stelen in cultuurbuizen. Drie dezer cultuurbuizen (groep I) werden gezet in een kamer met een temperatuur van 17°—21° C.; hier vormden zich na ongeveer 8 dagen reeds zeer veel pycniden. Zes andere buizen (groep 2) werden gezet in een koelruimte waar de temperatuur wisselde van 0 tot 5° C. Na verloop van een maand had zich in deze laatste buizen veel mycelium gevormd. Pycniden waren echter nog niet aanwezig. Een drietal dezer buizen werd toen overgebracht naar een kamer met een temperatuur van 17° tot 21° C., waar zich nu na 5 dagen zeer veel pycniden vormden.

De overige drie buizen (groep 3) bleven nog een maand langer in de koelruimte; toen hadden zich ook in deze buizen enkele pycniden gevormd. Van elke groep werden vervolgens pycnosporen uitgezaaid op selderij-agar. Het bleek toen, dat in groep 1 en 2 uitsluitend sporen van den micro-vorm aanwezig waren, doch in groep 3 waren tot een belangrijk percentage sporen van den macro-vorm ontstaan.

HOOFDSTUK II.

DE LOCALE RASSEN VAN PHOMA APIICOLA EN DE VORMEN DAARVAN IN REINCULTUUR.

1. *Groei op verschillende voedingsbodems.*

BENNETT (1921) kweekte zijn Phoma op verschillende voedingsbodems en beschreef den habitus en de kleur van het mycelium en de vorming van pycniden. Voor dien tijd was er geen medium bekend, waarop de zwam pycniden vormde; hij vond dat dit gemakkelijk plaats heeft op gesteriliseerde knolselderij, en op COONS' synthetische voedingsbodem.

Hij kwam verder tot de conclusie, dat in 't algemeen op alle door middel van agar bereide vaste media en op gesteriliseerde plantendeelen, gesteriliseerde knolselderij uitgezonderd, een geringe pycniden-vorming plaats heeft: dit was ook reeds door WESTERDIJK en VAN LUYK (1920) geconstateerd. Dat agarplaten ongunstig zijn voor de vorming der pycniden kwam in mijn onderzoek in een bepaald geval duidelijk naar voren. De macro-vorm gaat gemakkelijk tot pycnide-vorming over op filtreerpapier, gedrenkt in COONS' voedingsoplossing. Wordt echter aan deze oplossing 1½ % agar toegevoegd, zoodat men een vaste voedingsbodem krijgt en ent men daarop den macro-vorm, dan ontstaan de pycniden in veel geringer aantal en na langeren tijd. Deze minder gunstige ontwikkeling meen ik voor een groot deel te moeten toeschrijven aan gebrek aan vochtigheid. Ik kweekte de twee zwam-vormen, die ik na cultuur op gesteriliseerden selderijknol verkreeg en ook de zwam, zooals die van de plant geïsoleerd was, op verschillende voedingsbodems, waar op ook BENNETT zijn Phoma-ras kweekte en op nog eenige andere substraten; ik lette behalve op de groeiwijze weer speciaal op de vorming van pycniden. Daar de Venlosche vormen niet groeien op COONS' oplossing en de macro-vorm op gesteriliseerde knolselderij voortdurend den micro-vorm afsplitst, moest er gezocht worden naar een medium, waarop ook de Venlosche macro-vorm pycniden maakt, zonder dat de micro-vorm afgesplitst wordt.

De resultaten van de kweekproeven, die hiervoor noodig waren, zijn vermeld in de hieronder volgende tabel I.

TABEL I. MYCELIUM-GROEI EN PYCNIDE-VORMING OP VERSCHILLENDE VOEDINGSBODEMS.

MYCELIAL GROWTH AND FORMATION OF PYCNIDIA ON DIFFERENT MEDIA.

1	2	3	4	5	6	7	8
Voedingsbodem. Medium.	Gegevens van Bennett. Bennett's data.	Phoma apiicola geïsoleerd van een Maastrichtschen selderijknol. Ph. a. isolated from Maastricht turnip-rooted celery plant.	Phoma apiicola geïsoleerd van een Venloschen selderijknol. Ph. a. isolated from Ven o turnip-rooted celery plant.	Maastrichtsche macro-vorm. Maastricht macro-form.	Venlosche macro-vorm. Venlo macro-form.	Maastrichtsche micro-vorm. Maastricht micro-form.	Venlosche micro-vorm. Venlo micro-form.
Selderij-agar. Celery-agar.	„Growth good, considerable submerged mycelium; aerial mycelium slightly tinged with blue. Pycnidia scarce."	Veel luchtmycelium; aanvankelijk wit, later grijsgroen van kleur. Na eenigen tijd ontstaan hier en daar enkele pycniden. Abundant aerial mycelium. Colour in the beginning white, later grey-green. Pycnidial formation scarce.				Weinig luchtmycelium, groeit vlak over de agar. Spoedig zeer veel pycniden. Mycelium growth strictly attached to the medium. Many pycnidia.	
Kers-agar. Cherry-agar.	—	Zeer veel luchtmycelium; aanvankelijk wit, later blauwgroen van kleur. Geen pycniden. Abundant aerial mycelium. Colour at first white, later becoming bluish-green No pycnidia.				Mycelium-groei zeer slecht, vooral bij 24° C. Wanneer mycelium zich ontwikkelt, dan vele pycniden. Mycelium growth very poor, espe cially at 24° C.	
Havermout-agar. Oatmalt-agar.	—	Zeer veel luchtmycelium. Geen pycniden. Abundant aerial mycelium. No pycnidia.				Zoo goed als geen luchtmycelium, bijna uitsluitend pycniden. Mycelial growth scarce, only pycnidia.	
Rijst. Rice	„Growth abundant. Color of rice changed from white to orange; mycelium varying from	Zeer veel luchtmycelium, aanvankelijk wit, later blauwgroen van kleur. De witte kleur van de rijst gaat in de nabijheid van het mycelium over in oranje. Soms enkele pycniden in oude cultures. Abundant aerial mycelium, colour at first white, later bluish-green. Colour of rice changed from white to orange. Some pycnidia in old cultures.				Bijna geen mycelium ontwikkeling. Zoo goed als uitsluitend pycniden. Hardly any mycelial development. Only pycnidia.	

		Pycnidia are formed within 14 days.				pycnidia.	
Extract van afgestorven bladeren. Extract of dead leaves.	—	Betrekkelijk weinig luchtmycelium; wit, later grijsgroen van kleur. Weinig pycniden. Aerial mycelium at first white, later greyish-green. A few pycnidia.	—	—	Groei en pycniden vorming, zooals aangegeven in kolom 3. Growth and pycnidia formation as described in column 3.	—	—
Coons' voedingsoplossing op filtreerpapier. Coons' synthetic solution on filter paper.	„Mycelial growth scarce; at first white. Later turning dark. Pycnidia very abundant."	Tamelijk veel luchtmycelium, aanvankelijk wit, later donker van kleur, zeer veel pycniden Aerial mycelium rather abundant. Colour at first white later black. Pycnidia abundant.			Geen groei. No growth.	Weinig mycelium. Zeer veel pycniden. Very scarce aerial mycelium. Pycnidia very abundant.	Geen groei. No growth.
Richards' voedingsoplossing op filtreerpapier. Richards' synthetic solution on filter paper.	„At first submerged coming to the surface very dense masses formed; color varying from white to black. No pycnidia observed."	Veel mycelium, wit, later donker van kleur. Het filtreerpapier wordt in de omgeving van het mycelium wijnrood van kleur. Geen pycniden. Much mycelium at first white, later dark. Paper turns winered in neighbourhood of mycelium. No pycnidia.			Geen groei. No growth.	Zeer weinig luchtmycelium. Zeer veel pycniden. Mycelium development scarce. Pycnidia very abundant.	Geen groei. No growth.
Havermeelagar. Oatmeal-agar.	„Mycelium abundant, black masses of mycelium formed at the edges of cultures. Pycnidia have been found in old cultures."	—			—	—	—

Hetgeen in deze tabel vermeld is, heeft betrekking op cultures, die slechts korten tijd als reincultuur op kunstmatige voedingsbodems gegroeid zijn.

What is said in this table holds good only for cultures grown for a short time on artificial media.

Voor een goed inzicht dient men onderscheid te maken tusschen *Phoma apiicola* KLEBAHN, zooals zij geïsoleerd wordt van de zieke plant en de twee vormen, die uit deze zwam te voorschijn komen, nadat zij pycniden gevormd heeft op gesteriliseerden selderij-knol. Wanneer men afgaat op KLEBAHN's diagnose van *Phoma apiicola* zouden de beide macro-vormen (de Venlosche en de Maastrichtsche) zoowel wat morphologische als wat physiologische eigenschappen betreft, daarmede identiek moeten zijn. De Venlosche macro-vorm, die ontstaat uit pycniden gevormd op gesteriliseerde knolselderij, wijkt echter af van de oorspronkelijke Venlosche *Phoma apiicola* doordat hij het vermogen om op COONS' en RICHARDS' oplossing te groeien verloren heeft.

Uit de tabel blijkt, dat gesteriliseerde selderijbladstelen een zeer goeden voedingsbodem vormen in zooverre als daarop spoedig pycniden in groot aantal ontstaan zoowel van den Maastrichtschen als van den Venloschen macro-vorm. Ook op aftreksel van afgestorven bladeren maken alle vormen pycniden, evenwel in veel mindere mate dan op de bladstelen.

§ 2. *Vergelijking van de locale rassen en de vormen daarvan op eenzelfden voedingsbodem.*

COONS (1917) en BENNETT (1921) vergeleken het Phoma ras, dat zij in reincultuur uit Nederland ontvangen hadden met een ras, dat zij in Michigan isoleerden. Aanvankelijk werd geconstateerd, dat het Europeesche ras lichter van kleur was, dan het Amerikaansche; later bleek echter, dat het laatste ras de donkere kleur door lang voortgezette cultuur op kunstmatige voedingsbodems verloor, zoodat de beide schimmels in dit opzicht niet meer van elkaar te onderscheiden waren. Evenmin konden morphologische of physiologische verschillen gevonden worden, zoodat het Europeesche ras voor identiek gehouden werd met het Amerikaansche.

Met het oog op de mogelijkheid van het bestaan van physiologische rassen ging ik bij mijn onderzoek uit van zieke knollen gegroeid op kleigrond (Maastricht) en op humusrijken zandgrond (Venlo).

Uit het voorgaande hoofdstuk is gebleken, dat er direct na de isolatie geen verschil merkbaar is tusschen de beide zwammen. Nadat echter de vorming van pycniden op gesteriliseerden selderij-knol heeft plaats gehad, onderscheiden zij zich door een in 't oog vallend kenmerk, nl. door hun gedrag op COONS' en RICHARDS' oplossing. De Maastrichtsche zwamvormen groeien ook daarna nog uitstekend op deze voedingsoplossing, de Venlosche daarentegen in 't geheel niet. Dit werd het eerst gecon-

stateerd in een cultuur, die als mycelium uit zieke knollen was geïsoleerd en nadien op gesteriliseerde knolselderij pycniden had gevormd. Van deze pycniden werd een groot aantal sporen geënt telkens in achttien cultuurbuizen met COONS' en met RICHARDS' oplossing. Het verschil tusschen de Venlosche en de Maastrichtsche cultures kwam in iedere partij van achttien buizen, zoowel in die met COONS' als in die met RICHARDS' oplossing zeer duidelijk te voorschijn. De cultures, die ik nu gedurende twee jaren op verschillende voedingsbodems en onder verschillende omstandigheden gekweekt heb en waarmee ik herhaalde malen planten infecteerde, vertoonen nog steeds het verschillend gedrag ten opzichte van de twee synthetische media. Toch is het mogelijk, dat dit verschil tusschen de beide plaatselijke rassen onder bepaalde omstandigheden weer verloren zal gaan. Ik heb dat ééns kunnen constateeren toen bij een proefneming 80 cultuurbuizen met COONS' oplossing geënt werden met sporen van den Venloschen micro-vorm. Na een bepaalden tijd, die voor ieder der buizen verschillend was, trad er in 7 buizen myceliumontwikkeling op. Blijkbaar waren er in deze buizen sporen aanwezig geweest, waarvan de kiemhyphen zich na korter of langer tijd hadden aangepast aan dezen voedingsbodem. In de andere 73 buizen trad niet de minste groei op. Aan een verontreiniging kan dit niet worden toegeschreven. Hiermede is niet gezegd, dat er een overgang plaats heeft gevonden van het Venlosche in het Maastrichtsche ras.

Wij hebben hier te maken met twee rassen het Venlosche en het Maastrichtsche, die zich aanvankelijk in dit opzicht niet van elkaar onderscheiden, maar die, na op een bepaalden voedingsbodem pycniden gevormd te hebben, niet precies meer dezelfde eischen aan hun substraat stellen. Dit verschillend gedrag is voldoende om de Venlosche en Maastrichtsche cultures als physiologisch verschillende rassen op te vatten, temeer waar er bovendien, zooals aanstonds zal blijken, ook morphologische verschillen aanwezig zijn.

Dit is echter niet de eenige verandering, die *Phoma apiicola* KLEBAHN ondergaat door een groei op gesteriliseerden selderijknol. Door pycnide-vorming op dezen voedingsbodem splitst zoowel de Venlosche als de Maastrichtsche cultuur een zwamvorm af, die zich duidelijk en in een belangrijke eigenschap van de oorspronkelijke zwam onderscheidt. Er ontstaat hier namelijk de micro-vorm.

Door de pycnide-vorming op gesteriliseerden selderij-knol vallen dus de twee cultures, die zich oorspronkelijk in niets van elkaar onderscheidden uiteen in 4 verschillende typen, die ten opzichte

van een bepaalde eigenschap twee aan twee gelijk zijn. Dit moge blijken uit het volgend overzicht.

	Vormen niet gemakkelijk pycniden op kunstmatige voedingsbodems	Vormen gemakkelijk pycniden op kunstmatige voedingsbodems
Groeien goed op COONS' en RICHARDS' opl.	Maastrichtsche „macro-vorm"	Maastrichtsche „micro-vorm"
Groeien niet goed op COONS' en RICHARDS' opl.	Venlosche „macro-vorm"	Venlosche „micro-vorm"

Dat de verschillen tusschen de twee locale rassen niet alleen van physiologischen maar ook van morphologischen aard zijn, komt duidelijk tot uitdrukking door de twee vormen van elk dezer rassen te kweeken op COONS' oplossing, die door toevoeging van 1½ % agar tot een vasten voedingsbodem gemaakt is. Hierdoor zijn blijkbaar de omstandigheden voor de Venlosche vormen in zooverre gunstiger geworden, dat er eenige groei kan optreden.

De hier volgende beschrijvingen worden door photo's verduidelijkt. (Pl. XVIII fig. 6 en 7).

De Maastrichtsche macro-vorm vertoont een dik, wollig aaneengesloten mycelium, lichtgrijs van kleur; de afmeting der kolonie 14 dagen na enting is: 30 × 25 cm; ongeveer 4 weken na enting zijn enkele pycniden in het luchtmycelium aanwezig, dit is vrij van vochtdruppels.

De Venlosche macro-vorm maakt een minder dik, wollig mycelium; de dikte hiervan is niet op alle plaatsen dezelfde, doch er zijn inzinkingen, zoodat de kolonie een sponsachtig uiterlijk heeft. De kleur is bruinachtig, terwijl hier en daar vochtdruppeltjes in het mycelium ontstaan. De afmeting der kolonie is: 20 × 20 cm. Er ontstaan geen pycniden. Er dient opgemerkt te worden, dat deze macro-vorm afkomstig is van een cultuur, die een maand geleden opnieuw geïsoleerd was uit een kunstmatig geïnfecteerde plant, zoodat de minder goede groei niet toe te schrijven is aan verblijf op minder gunstige voedingsbodems.

De Maastrichtsche micro-vorm groeit gelijkmatig en vormt weinig luchtmycelium, terwijl over de geheele kolonie pycniden ontstaan. De habitus is eenigszins geveerd. De afmeting van de kolonie 14 dagen na enting is: 38 × 20 cm. De kleur van de kolonie is grauwgrijs.

De Venlosche micro-vorm groeit niet zoo gelijkmatig over den voedingsbodem; van de entplaats groeien bepaalde takken uit; daar komen weer kleinere zijtakken uit voort. De kolonie krijgt daardoor een geveerd uiterlijk. Pycniden ontstaan alleen in het alleroudste mycelium, vooral rondom de entplaats, overigens zijn ze zeldzaam. De kleur van de kolonie is geel.

De beide micro-vormen bleken onder de meeste omstandigheden constant te blijven, ook door infectie en her-isolatie van de bovenaardsche deelen van selderijplanten had er geen overgang in den macro-vorm plaats. Slechts in de zeer bijzondere gevallen, die in § 2 van het vorige hoofdstuk beschreven werden, heb ik dien overgang kunnen constateeren.

HOOFDSTUK III.

CONJUNCTPYCNIDEN.

1. *De ontdekking der conjunctpycniden.*

Een zeer merkwaardig verschijnsel doet zich voor wanneer men de beide hiervoor besproken zwamvormen, de micro- en de macro-vorm, op eenigen afstand van elkaar uitzet, b.v. op selderijagar. Er ontstaat namelijk daar, waar de mycelia der beide vormen elkaar ontmoeten een reeks zwarte puntjes, die als een lijn de scheiding tusschen de twee kolonies aangeeft. (Plaat XVII fig. 4). Door microscopisch onderzoek werd uitgemaakt, dat 't pycniden zijn; in het vervolg zullen ze conjunctpycniden genoemd worden. De kleur dezer pycniden is lichtgeel, het ostium is zwart, ze zijn bolvormig en de diameter is 200—250 μ. Zij komen dus over het algemeen vrijwel overeen met de pycniden, die men aantreft op den voet der bladstelen van zieke planten en ook met de pycniden van den macro-vorm. Onder het microscoop kan men zeer goed de voor Phoma typische sporenranken te voorschijn zien komen. De sporen hebben hetzelfde uiterlijk en dezelfde afmetingen als de sporen van den micro- en den macro-vorm, die zooals ik hiervoor reeds vermeldde, niet van elkaar in groote verschillen.

In de literatuur zijn enkele gevallen bekend van een bevordering der fructificatie van schimmels door stoffelijke invloeden. Zoo kon Mc.Cormick (1926) perithecia van *Thielavia basicola* Zopf in grooten getale doen ontstaan door de zwam te besproeien met een waterig extract van bepaalde schimmels. Atanasoff (1920) nam waar, dat *Gibberella Saubinetii* (Mont) Sacc door niet nader bepaalde bacteriën tot de vorming van perithecia wordt geprikkeld. Een dergelijken gunstigen invloed op de peritheciën-vorming oefent volgens Wilson (1927) een Penicillium op *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. uit. Een waterig aftreksel van Penicillium had hetzelfde effect; wanneer dit in een autoclaaf gesteriliseerd was, werd dit effect minder groot.

Daar de conjunctpycniden veel gelijken op de pycniden van den macro-vorm, is men geneigd ter verklaring van haar ontstaan te veronderstellen, dat de macro-vorm, tengevolge van de aanwezigheid van den micro-vorm in zijn onmiddelijke nabijheid, tot intense pycnide-vorming overgaat, wat zonder de aanwezig-

heid van den micro-vorm, althans op agar-voedingsbodems, niet gebeurt. Ter verklaring van dit verschijnsel zou men zich kunnen denken, dat op de ontmoetingslijn een bepaalde voedingstoestand tot stand komt, waardoor pycnide-vorming begunstigd wordt of dat de micro-vorm een zeker vocht afscheidt, waardoor de macro-vorm tot grootere pycnide-vorming gebracht wordt.

Om na te gaan of hier iets dergelijks plaats heeft werd de micro-vorm gekweekt in een waterig aftreksel van selderij-knol. Nadat er geen verdere groei van de schimmel meer plaats had, werd de rest van het vocht door een Chamberland-bougie gefiltreerd en het doorgeloopen sap rondom den halven omtrek van enkele kolonies van den macro-vorm gebracht; om den anderen halven omtrek werd knolaftreksel gebracht, dat, ten einde het kiemvrij te maken, eveneens door een Chamberland-kaars was gefiltreerd. Dit werd eenige malen herhaald. De kolonies van den macro-vorm groeiden verder zonder dat er ook maar een enkele pycnide ontstond.

Vervolgens isoleerde ik afzonderlijke conjunctpycniden en bracht ze elk afzonderlijk over in buizen met steriel water. Een weinig van de verkregen sporensuspensie werd uitgezaaid in meerdere petrischalen met selderij-agar. Na verloop van een tiental dagen kon men duidelijk met het bloote oog waarnemen, dat de twee zwamvormen in iedere schaal aanwezig waren. Een dezer vele schalen is op Pl. XVII fig. 5 weergegeven; men ziet daarin niet alleen verschillende kolonies van den aan pycniden rijken micro-vorm, en de witwollige kolonies van den pycnidenvrijen macro-vorm, doch men ziet ook duidelijk, dat tusschen de jonge kolonies dezer twee zwamtypen nieuwe conjunctpycniden zijn ontstaan. Daar echter waar mycelia van hetzelfde type elkaar ontmoeten, ontstaan deze conjunctpycniden niet. Men moet uit deze proef tot het besluit komen, dat de conjunctpycnide sporen bevat van beide zwamvormen. Bij het isoleeren van deze conjunctpycniden werden bijzondere voorzorgen genomen. Wanneer men ze isoleert, terwijl de kolonies van den micro-vorm reeds haar eigen kleine pycniden gevormd hebben, loopt men de kans, dat bij het isoleeren eener conjunctpycnide, „verontreiniging" plaats vindt door aanklevende sporen van de in de buurt liggende pycniden van den micro-vorm. Doordat deze sporen zoo klein zijn, zouden ze in betrekkelijk groot aantal mee overgeënt kunnen worden. Om deze mogelijkheid uit te sluiten moesten conjunctpycniden afgezonderd worden op een tijdstip, waarop de micro-vorm zelf nog geen pycniden gevormd had. Dit was alleen mogelijk door uit te gaan van zeer jonge kolonies, daar de micro-vorm op alle door mij beproefde voedingsbodems reeds zeer

spoedig (ongeveer 10 dagen na uitzaaiing) pycniden begint te vormen. Ik mengde daarom sporensuspensies van den Venloschen micro- en den Maastrichtschen macro-vorm en bracht een kleine hoeveelheid van dit mengsel over in een groot aantal petrischalen, in de hoop, dat er enkele kolonies der beide zwamtypen zeer dicht bij elkaar zouden liggen en dat de mycelia elkaar ontmoet en conjunctpycniden gevormd zouden hebben, nog voordat er aan den microvorm kleine pycniden ontstaan zouden zijn. Met enkele kolonies was dat inderdaad het geval. Met behulp van het binoculair microscoop werden toen verscheidene conjunctpycniden afzonderlijk geïsoleerd. Daarbij werd er op gelet, dat geen enkele andere pycnide in de omgeving lag. Met opzet werden sporen gemengd van een micro- en een macro-vorm, die tot twee verschillende locale rassen behoorden, omdat ik meende opgemerkt te hebben, dat dan spoediger conjunctpycniden ontstaan dan bij vormen, die tot eenzelfde locaal ras behooren. Deze isolatie werd mij bij een herhaling dezer proef vergemakkelijkt doordat ik toen de beschikking had over een selderij-agar, waarop de microvorm eerst na 15—20 dagen zijn pycniden begon te vormen. De kleur van de kolonies van den micro-vorm was op dezen agar geel, hetgeen op de selderij-agar, die ik voordien gebruikte, ook niet het geval was. Waardoor deze agar zich van de vroeger gebruikte onderscheidde, is mij niet bekend; de bereidingswijze was dezelfde als hierboven is aangegeven; hij werd echter gemaakt van knollen die tot Maart in een kelder bewaard waren; enkele dezer knollen waren voor een gedeelte rot; dit gedeelte werd weggesneden en de rest van den knol werd gebruikt. Het lijkt mij waarschijnlijk, dat het sap dezer knollen daardoor eenigszins anders van samenstelling is geweest dan dat der vroeger gebruikte.

Tientallen conjunctpycniden zijn geïsoleerd en de sporen daarvan in vele petrischalen uitgezaaid. Het resultaat was steeds, dat in elke schaal de beide zwamtypen aanwezig waren. De verhouding tusschen die twee vormen heb ik niet in getallen vastgelegd, doch wel heb ik opgemerkt, dat de macro-vorm telkens in grooter aantal aanwezig was dan de micro-vorm.

Zooals uit het vorige blijkt, komt uit een conjunctpycnide zoowel de eene als de andere vorm te voorschijn; zoo'n pycnide moet dus opgebouwd zijn uit deelen van de beide zwamvormen.

Voor het ter perse gaan kreeg ik nog inzage van een onderzoek van Massey (1928) handelende over de „dry-rot" ziekte van Gladiolus.

M. kweekte o.a. cultures van *Sclerotium gladioli* Massey van verschillende herkomst tegenover elkaar in één petrischaal. Het bleek toen, dat, wanneer mycelia van bepaalde cultures elkaar

ontmoetten, op de grenslijn zeer vele sclerotiën ontstonden. Op deze manier kon hij zijn cultures in twee groepen verdeelen, die, welke wel met elkaar door de vorming van sclerotiën reageerden en die, welke dat niet deden. Het is niet nader onderzocht hoe men het ontstaan dezer sclerotiën moet opvatten.

2. *Hypothesen over het ontstaan der conjunctpycniden.*

Pycniden, aan welker opbouw twee verschillende zwamvormen deelnemen, zijn in de literatuur nog niet beschreven. In meerdere opzichten komt echter het gedrag dezer zwamvormen overeen met het verschijnsel van heterothallisme. In vele gevallen van heterothallisme toch kan men een langzamen groeier met weinig luchtmycelium en een snellen groeier met veel luchtmycelium onderscheiden. Meer speciaal doet het in het vorig hoofdstuk beschreven verschijnsel denken aan hetgeen Edgerton (1914) vermeldt over enkele Glomerella soorten. Een verschil bestaat echter hierin, dat op de grenslijn der twee vormen van *Phoma apiicola* pycniden ontstaan, terwijl bij de Glomerella soorten zich daar peritheciën vormen, zooals wij aanstonds zullen zien.

Daar er bij de onderzoekingen omtrent de vorming van pycniden nooit eenige aanwijzing gevonden is, dat hierbij een bevruchting plaats heeft, is het niet waarschijnlijk, dat de conjunctpycniden aan een geslachtelijk proces hun ontstaan danken. Toch lijkt het verschijnsel der conjunctpycnide-vorming zoo op dat van heterothallisme, dat het noodig is dit laatste meer van nabij te beschouwen, hetgeen in de volgende § zal geschieden.

Een mijns inziens meer voor de hand liggende en meer aannemelijke verklaring van het ontstaan der conjunctpycniden is de volgende: Aan den opbouw dezer pycniden nemen hyphen der beide zwamvormen deel zonder dat er een overgang en een daaropvolgende versmelting van celkernen plaats heeft. De zwamdraden der beide vormen behouden dus in de conjunctpycnide hun individueele eigenschappen, zoodat tenslotte ieder zijn eigen sporen afscheidt; deze hebben precies dezelfde eigenschappen als de sporen, waaruit de twee oorspronkelijke kolonies ontstaan zijn.

Een conjunctpycnide zou in dit geval te beschouwen zijn als een vruchtlichaam, dat onstaan is uit dooreengestrengelde hyphen, die tot twee verschillende zwamindividuën behooren. Een dergelijk lichaam zou te vergelijken zijn met een hyperchimaere, zooals Strasburger (1909) zich die bij hoogere planten mogelijk

dacht. Bij een dergelijke chimaere zouden namelijk de cellen der twee componenten niet sectoraal of periclinaal, maar door elkaar heen liggen.

Dat een conjunctpycnide op een dergelijke manier zou zijn gevormd, lijkt mij niet onwaarschijnlijk in verband met hetgeen bekend is over de ontstaanswijze der pycniden in 't algemeen. In § 4 zal hetgeen hierover in de literatuur bekend is, in het kort worden nagegaan.

3. *Literatuur over homo- en heterothallisme.*

Hetgeen over deze verschijnselen in de laatste jaren bekend geworden is, meen ik in 't kort te moeten vermelden, zoover het in verband met de beoordeeling van de resultaten van eigen onderzoek van belang kan zijn. Het woord heterothallisme werd het eerst gebruikt door BLAKESLEE (1920), die in sommige species der Mucorineae twee verschillende individuen kon onderscheiden, wier beider samenwerking noodzakelijk is voor het tot stand komen van een zygospore; hij beschouwde deze twee zwammen als geslachtelijk verschillend gedifferentieerd.

Heterothallisch noemt men een species, wanneer men daarin geslachtelijk verschillende individuën kan onderscheiden, die moeten samenwerken voor de vorming van het diploïde stadium. De geslachtelijke vruchtvorm ontstaat door samensmelting van twee celkernen, die deel uitmaken van twee geslachtelijk verschillende individuën.

Homothallisch is een species, wanneer één individu de geslachtelijke vruchtvorm kan doen ontstaan; het diploïde stadium komt hier tot stand door samensmelting van twee celkernen, die deel uitmaken van een en hetzelfde individu.

Door de onderzoekingen der laatste jaren is gebleken, dat het verschijnsel van heterothallisme in bijna alle groepen der schimmels voorkomt; bij de Phycomyceten, Ascomyceten en Basidiomyceten, Uredineae en Ustilagineae inbegrepen.

Door zijn uitgebreid en baanbrekend onderzoek bij de Mucorineae heeft BLAKESLEE bij vele species dezer groep rassen kunnen onderscheiden, die geslachtelijk gedifferentieerd zijn. Het was echter niet altijd mogelijk die rassen morphologisch te onderscheiden, zoodat hij niet kon uitmaken welk ras het mannelijke en welk ras het vrouwelijke was. Hij duidde ze daarom aan als + en — rassen. Daar het woord rassen in verband met de beteekenis, die men daaraan hecht in de plantenteelt, mij minder geschikt voorkomt, wil ik hier verder liever spreken van + en — componenten.

Het gelukte niet om door kruising van de + component van de eene species met de — component van de andere bestaarden te kweeken. De componenten van twee verschillende species reageeren nu slechts in zooverre, dat wel de twee progameten gevormd worden; de tusschenwand wordt echter niet opgelost, zoodat er geen versmelting van kernen kan plaats hebben. BLAKESLEE noemt dit een „onvolkomen zygospore". Het viel BLAKESLEE op, dat bij vele species de eene component een grootere vegetatieve groeikracht heeft dan de andere.

Bij de Ascomyceten zijn eveneens eenige gevallen van heterothallisme bekend geworden.

DODGE (1920) vermeldde, dat éénspore-cultures van *Ascobolus magnificus* ten opzichte van zich zelf steriel zijn; er ontstaan in dergelijke cultures geen geslachtelijke organen, doch deze ontstaan eerst wanneer twee mycelia van tegengesteld geslacht elkaar ontmoeten.

BETTS (1926) vond een dergelijk geval bij *Ascobolus carbonarius;* het gelukte hem te bewijzen, dat in één ascus 4 sporen van het eene geslacht en vier sporen van het andere geslacht aanwezig zijn.

EDGERTON (1914) beschrijft enkele + en — componenten van *Glomerella* soorten. Uit cultures, die hij van *Ipomoea purpurea* en van andere planten isoleerde, zonderde hij twee van elkaar verschillende kolonies af. De component, die later + genoemd werd, ontwikkelt veel wollig luchtmycelium, wit of lichtgrijs van kleur; peritheciën ontstaan in groepen (in raised masses or nodules). De asci en ascosporen zijn altijd goed ontwikkeld. De + component groeit sneller dan de — component. Deze laatste vormt bijna geen luchtmycelium maar wel peritheciën in overloed zoo zelfs, dat de cultures er zwart van zien. De peritheciën zijn echter onvolledig ontwikkeld, blijven klein en worden meestal niet rijp. Zet men nu deze twee componenten op eenigen afstand van elkaar op een voedingsbodem, dan ontstaat in de lijn, waar de mycelia elkaar ontmoeten, een groot aantal peritheciën. Deze zijn goed ontwikkeld en vormen zich vlugger dan die der componenten afzonderlijk. Deze peritheciën zouden volgens EDGERTON ontstaan, tengevolge van een geslachtelijk proces, dat plaats vindt tusschen de beide componenten en niet tengevolge van een of andere prikkelwerking. EDGERTON motiveerde zijn meening aldus: enkele nog niet geheel rijpe asci werden door hem uit een op de ontmoetingslijn gevormd perithecium geïsoleerd en afzonderlijk op een voedingsbodem overgebracht. Na ontkieming der sporen bleek, dat uit één ascus de twee componenten te voorschijn waren gekomen. Hieruit concludeerde hij, dat deze sporen

ontstaan zijn als gevolg van reductiedeeling, aan welke vóór de ascusvorming karyogamie moet zijn voorafgegaan. Want op grond van de onderzoekingen o.a. van CLAUSEN (1912) bij *Pyronema confluens* (PERS) TUL. en HARPER (1905) bij *Phyllactinia corylea* (PERS) KARST. en *Erysiphe cichoracearum* neemt men aan dat dit het algemeen bij peritheciën voorkomend type van geslachtelijke voortplanting is.

Ofschoon het bij de Ascomyceten mogelijk is uit te maken wat de mannelijke en wat de vrouwelijke component is, noemt EDGERTON de twee verschillende zwamtypen + en — rassen.

Het boven bedoelde geval van heterothallisme valt buiten de omgrenzing, die men zich op grond van vroegere waarnemingen van dit begrip gemaakt had, daar beide componenten bij de Glomerella's afzonderlijk óók den geslachtelijken vruchtvorm kunnen doen ontstaan. EDGERTON stelt om die reden de volgende hypothese op. De — component, zal een vrouwelijke component zijn met slecht ontwikkelde antheridiën en zeer veel oögoniën. Hieruit ontstaan vele doch onvolledig ontwikkelde peritheciën. De + component zal zeer veel antheridiën ontwikkelen doch slechts weinig oögoniën. Wanneer beide componenten te zamen komen dan zullen op de grenslijn zoowel antheridiën als oogoniën in groot aantal aanwezig zijn, zoodat er zeer veel peritheciën zullen ontstaan.

EDGERTON heeft de juistheid van zijn veronderstellingen niet bewezen door nader onderzoek.

Deze verschijnselen komen in groote trekken overeen met die, welke ik vond bij *Phoma apiicola*; het groote verschil is echter, dat bij Glomerella peritheciën en bij *Phoma apiicola* pycniden ontstaan.

In de groep der Basidiomyceten is het verschijnsel van homo- en heterothallisme uitvoerig onderzocht door BENSAUDE (1918), KNIEP (1919), VANDENDRIES (1923), BRUNSWIK (1924), MOUNCE (1921), HANNA (1925), CRAIGIE (1927), STAKMAN and CHRISTENSEN (1927), e.a.

Men onderscheidt bij de Basidiomyceten:

a. primair mycelium, dat ontstaat uit de kiemende basidiosporen; dit is te vergelijken met het vegetatieve, éénkernige mycelium der Ascomyceten.

b. secundair mycelium; dit is steeds tweekernig en vormt uitsluitend de geslachtsorganen. In dit mycelium heeft eerst de kernversmelting plaats en later de reductiedeeling. Het typische verschil met het primair mycelium is de aanwezigheid der zoogenaamde „gespen". Deze zijn zijdelingsche uitgroeiingen der hyphen, die van de oude cellen naar de daaruit door deeling ontstane nieuwe

cellen groeien en daarin dochterkernen van de ouderkernen overvoeren.

c. tertiair mycelium; dit zijn hyphencomplexen, waaraan een bepaalde functie toekomt; men rekent ertoe te behooren: sklerotiën, rhizomorphen, het mycelium der vruchtlichamen etc.

In de groep der Basidiomyceten is de geslachtelijke differentiatie verder ontwikkeld dan bij de Phycomyceten en Ascomyceten; sommige species zijn niet slechts bipolair maar multipolair gedifferentieerd; er zijn niet slechts + en — componenten, doch meer geslachtelijk verschillende componenten, waarvan er telkens twee bepaalde moeten samenwerken bij het bevruchtingsproces.

Homothallisch is nu een species, wanneer het secundair mycelium na korteren of langeren tijd kan ontstaan uit het primaire mycelium eener éénspore cultuur.

Heterothallisch is een species, wanneer het secundair mycelium slechts dan kan ontstaan wanneer twee geslachtelijk verschillende mycelia aanwezig zijn. Zoowel vele heterothallische als homothallische species heeft men in deze groep kunnen vinden.

Het blijkt uit dit overzicht der literatuur, dat het verschijnsel van heterothallisme verband houdt met geslachtelijke differentiatie, of dat men althans de gedachte aan een geslachtsproces eraan verbindt. Daar er geen reden bestaat om aan te nemen, dat er bij de vorming der conjunctpycniden een bevruchtingsproces plaats heeft, mag het verschijnsel dat bij *Phoma apiicola* optreedt, niet als een geval van heterothallisme beschouwd worden.

4. *Literatuur over de ontstaanswijze van pycniden.*

Aan het slot van zijn verhandeling over de ontstaanswijzen van pycniden zegt Bauke (1876) op pag. 485 en 486: „Bei der Entstehung der Pycniden traten, wie wir gesehen haben, Erscheinungen auf, welche lebhaft an den Befruchtungsvorgang bei der Entstehung der Perithecien von *Ascobolus* und anderer Schlauchpilze erinnern. In einigen Fällen legten sich nämlich an das Hyphenstück, aus welchem durch oft wiederholte Theilungen in beliebigen Richtungen des Raumes der Körper der Pycnide hervorgeht, von allen Seiten Fäden an, um mit demselben, sowie auch unter einander fest zu verwachsen und auf diese Weise allmählich eine geschlossene Hülle zu bilden. Diese Hüllfäden waren dabei an ihren Enden häufig stark angeschwollen und zeigten auch sonst oft eine von der gewöhnlichen abweichende Form. In einem anderen Falle wurde ferner die Bildung der Pycnide immer durch die Verschlingung mehrerer z. Th. schraubig gewundener Hyphen

eingeleidet, welche darauf rings von einem Knäuel von gewöhnlichen Myzelfäden eingehüllt wurden.

Dass es sich hierbei weder das eine, noch das andere Mal um einen Befruchtungsvorgang handelt, wurde für den ersten Fall dadurch bewiesen, dass bei derselben Pycnide das in der Regel statthabende Auftreten der Hüllfäden nicht selten unterblieb, ohne dass die Entwicklung des Behälters dadurch irgendwie gehemmt worden wäre; in dem zweiten Falle kann aber schon desswegen von einem Geschlechtsakt keine Rede sein, weil weder in der Gestalt, noch in der Anordnung oder Zahl der schraubig gewundenen Hyphen die geringste Regelmässigkeit zu Tage trat, ein Pollinodium und ein Ascogonium also durchaus nicht zu unterscheiden war."

Sedert hebben verschillende onderzoekers over de vorming van pycniden geschreven: De Bary (1884); Baccarini (1890); Zopf (1890); von Tavel (1892;) Reddick (1911); Mercer (1913); Schegg (1915); Hesler (1916); Kempton (1919); Dodge (1923); in geen enkele hunner mededeelingen vindt men ook maar eenige aanwijzing, dat daarbij een geslachtelijk proces plaats vindt, zoodat men dan ook algemeen heden op het standpunt staat „dass die Pycniden den Höhepunkt in der Differenzirung des Condinien-tragenden Mycels darstellen, aber prinzipiell von Conidienträgern nicht verschieden sind und mit ihnen eine Nebenfruchtform darstellen." (Brefeld (1892), een standpunt ook door Klebahn (1918) ingenomen: „Alle diese verschiedenartigen Konidienfruchtformen bilden aber bei jedem der erwähnten Pilze nur eine einzige Art von Konidien aus, so dasz, so bemerkenswert ihr verschiedenartiger Bau ist, in ihnen doch nur Steigerungsgrade derselben Grundform zu sehen sind."

Dit standpunt wordt bevestigd door het feit, dat er nu en dan bij zwammen, die aanvankelijk wegens het bezit van pycniden tot de Sphaeropsidales gerekend werden, later wel eens peritheciën gevonden zijn, b.v. bij *Didymella lycopersici* (Brun.) Klebahn (1921).

Cytologisch zijn de pycniden niet onderzocht; slechts één opmerking wordt in deze richting gemaakt door Dodge (1923), die een histologisch onderzoek verrichtte bij 3 Sphaeropsidales: een Phyllosticta een Schizoparma en een Scleropsis soort. Het onderzoek van Dodge maakt het zeer waarschijnlijk, dat de eerst ontstane sporophoren desorganiseeren, waarop uit de cellaag daaronder nieuwe sporophoren ontstaan, die op hun beurt opgelost worden; zoo komt tenslotte de sporogene cellaag tegen den schorswand te liggen, terwijl de holte opgevuld is

met een gelatineuse massa. De protosporophoren, d.w.z. de sporophoren, die in het algemeen geen sporen afscheiden, doch meestal opgelost worden, bevatten twee celkernen, die dicht bij elkaar liggen. De sporophoren, die tenslotte ontstaan en die de sporen afscheiden, zijn alle éénkernig, terwijl de sporen weer tweekernig zijn.

Uit het onderzoek van DODGE blijkt niet wat voor een soort kerndeeling bij de sporevorming is opgetreden.

5. *Onderzoek naar de mogelijkheid eener bastaardeering.*

Het bleek mij onmogelijk te zijn om in den wirwar van hyphen na te gaan hoe de conjunctpycniden uit den micro- en den macro-vorm ontstaan, temeer omdat de hyphen der beide vormen microscopisch niet te onderscheiden zijn. Ik trachtte daarom langs een anderen weg een nader inzicht in dit proces te krijgen.

Er waren twee verschillende rassen aanwezig; ieder bestonden zij uit een micro- en een macro-vorm. Wanneer er zich pycniden ontwikkelden op de grens van een Venloschen macro- en een Maastrichtschen micro-vorm, dan zou de mogelijkheid kunnen bestaan, dat door uitwisseling van factoren onder de, na uitzaaiing der pycnosporen verkregen, kolonies niet alleen de Venlosche doch ook de Maastrichtsche macro-vorm voorkomt en dat eveneens onder de kolonies der micro-vormen niet alleen de Maastrichtsche doch ook de Venlosche optreedt. Wanneer dat zoo was, dan zou dit op een geslachtelijk proces wijzen. Een dergelijke mogelijkheid doet zich voor bij pycniden, die ontstaan op de grens van een Venloschen micro- en een Maastrichtschen macro-vorm. Om dit na te gaan werden in enkele petrischalen een Venlosche macro-vorm en een Maastrichtsche micro-vorm naast elkaar geplaatst. Op de grenslijn ontstonden spoedig conjunctpycniden; van verscheidene dezer werden de pycnosporen uitgezaaid. Door overenting op RICHARDS' oplossing bleek nu spoedig, dat van elk plaatselijk ras slechts die vorm aanwezig was, waarvan oorspronkelijk een kolonie was uitgezet. Van een bastaardeering was dus geen sprake.

Al is hiermede geen zeker bewijs geleverd voor de ongeslachtelijke vormingswijze der conjunctpycniden, toch wijst dit resultaat er op, dat de vorming op dezelfde wijze plaats vindt als men het voor pycniden in 't algemeen aanneemt. Ook het feit, dat bij uitzaaiing der sporen eener conjunctpycnide steeds een grooter aantal kolonies van den macro-vorm aanwezig is dan van den micro-vorm, wijst in deze richting.

HOOFDSTUK IV.

DEGENERATIE EN REGENERATIE.

1. *Literatuuroverzicht.*

Verschillende onderzoekers, die zwammen op steriele voedingsbodems kweekten, ondervonden, dat na korteren of langeren tijd bepaalde eigenschappen veranderden of geheel of gedeeltelijk verloren gingen.

PETHYBRIDGE (1916) zegt, dat *Verticillium alboatrum* REINKE et BERTHOLD, die pas geïsoleerd is, op een gesteriliseerden voedingsbodem na eenigen tijd donker van kleur wordt, hetgeen niet het gevolg is van het ontstaan van donkere chlamydosporen maar alleen van het donker worden van het mycelium. Na langdurige cultuur op een kunstmatigen voedingsbodem gaat de eigenschap om deze donkere kleur af te scheiden verloren. Volgens mondelinge mededeeling van Dr. J. H. H. VAN DER MEER heeft zij deze eigenschap bij *Verticillium alboatrum* niet zien verloren gaan gedurende de jaren 1919 tot 1925, waarin zij zich met het onderzoek van deze zwam bezig hield; wel waren in 't eind van 1926 de cultures, die zij in buizen op voedingsagar bewaard had, kleurloos geworden. Gedurende het onderzoek waren de cultures dikwijls overgeënt, terwijl dit na afloop van het onderzoek niet meer gedaan werd. VANDENDRIES (1923) vond, dat bij Basidiomyceten tusschen individuën van tegengesteld geslacht, die langeren tijd op de gebruikelijke steriele voedingsbodems gegroeid waren, geen geslachtelijk proces meer optrad.

Zeer interessant is hetgeen SCHNEGG (1915) meedeelt omtrent de vorming van pycniden van *Phoma conidiogena* SCHNEGG in verband met de degeneratie dezer zwam op verschillende voedingsbodems. Deze Phoma wordt zeer dikwijls aangetroffen in de wortleidingen der bierbrouwerijen. De wort schijnt een zeer geschikte voedingsbodem voor deze zwam te zijn. Op andere voedingsbodems is aanvankelijk de groei niet slecht; er worden daarop ook pycniden gevormd wanneer als uitgangsmateriaal conidiën gebruikt worden, die van een wortcultuur afkomstig zijn.

Wanneer de zwam echter een tijdlang op een anderen voedingsbodem gekweekt wordt, dan treden in de elkaar opvolgende gene-

raties meer en meer degeneratie-verschijnselen op en wel des te vlugger naarmate de voedingsbodem voor de zwam ongunstiger geweest is. Deze degeneratie kenmerkt zich door een tragere ontkieming der sporen, een minder krachtige mycelium-ontwikkeling en het verloren gaan van het vermogen om pycniden te vormen. SCHNEGG vermeldt, dat van alle onderzochte voedingsbodems alleen wort degene is, waarop zoowel een goede mycelium- als een pycnide-ontwikkeling gewaarborgd is.

APPEL en WOLLENWEBER (1913) meenen, dat een verandering in de morphologische en physiologische eigenschappen van sommige Fusariumsoorten optreedt, nadat zij gedurende langen tijd op een kunstmatigen voedingsbodem gegroeid zijn. Zij onderscheiden bij de cultures der Fusariumsoorten drie stadiën, die zij aanduiden met de namen: Ankultur, Normkultur en Abkultur.

Bij het opnieuw meten van sporen van Fusariumsoorten, die hij van de oorspronkelijke onderzoekers ontvangen had, vond BURKHOLDER (1925), dat de sporen dezer subcultures niet meer dezelfde afmetingen toonden als de eerste onderzoekers gevonden hadden. Hij meende dit te moeten toeschrijven aan het feit, dat deze species langeren tijd als reincultuur onder laboratoriumomstandigheden voortgekweekt waren, waardoor zij veranderingen ondergaan hadden. Om dit te onderzoeken vergeleek hij de soort *Fusarium martii phaseoli* BURK, die zes jaar in reincultuur was bewaard, met dezelfde soort, nadat hij haar na kunstmatige infectie, opnieuw van een boon geïsoleerd had en ook nadat hij haar tweemaal achter elkaar op een plant geënt en weer in reincultuur gebracht had. Hij komt dan tot de conclusie, dat deze Fusarium door groei op een sterielen voedingsbodem zoowel morphologisch als physiologisch verandert. Wanneer de zwam pas van een plant geïsoleerd is, is de kleur der kolonie op de meeste voedingsbodems blauwgroen, welke kleur verloren gaat bij een langdurige cultuur op de gebruikelijke voedingsbodems; passage door een plant doet haar terugkomen. Bij microscopisch onderzoek kwamen nog meer veranderingen aan 't licht: de als reincultuur bewaarde zwam was arm aan macro-conidiën terwijl zij in de twee maal opnieuw geïsoleerde kolonies in groote hoeveelheid aanwezig waren. Daarentegen vond men in de bewaarde cultuur zeer veel micro-conidiën, die in de opgefrischte cultures zeldzaam waren. Verder bleek, dat de bewaarde cultuur zeer veel aan infectievermogen ingeboet had; de cultuur, die eenmaal door een plant gepasseerd was, had dit infectievermogen ten deele teruggekregen, terwijl de cultuur, die tweemaal door een plant gepasseerd was, haar oorspronkelijke virulentie geheel herwonnen had.

BENNETT (1921) merkte op, dat *Phoma apiicola* KLEBAHN, die pas van een plant geïsoleerd is, een donkerder kleur heeft dan de zwam, die een tijdlang op steriele voedingsbodems is voortgekweekt.

WESTERDIJK en VAN LUIJK (1920) vermelden, dat verschillende pycnide-vormende zwammen, die in het Centraal Bureau voor Schimmelculturen gekweekt worden, het vermogen om deze vruchtlichamen te vormen op den duur verliezen. *Phoma Richardiae* MERCER groeide vijf jaren, *Phoma fictiles* DEL. vier jaren op gesteriliseerde voedingsbodems zonder dat deze eigenschap verloren ging; ook *Phoma conidiogena* SCHNEGG bleef pycniden vormen. Deze drie soorten zijn saprophyten. Parasitische soorten als *Phoma betae* FRANK, *Phoma oleracea* SACC. *Phoma apiicola* KLEBAHN en andere verloren spoedig het vermogen tot pycnidevorming. Zij trachtten na te gaan welke eischen elk van deze schimmels aan den voedingsbodem stelt. *Phoma betae* werd gekweekt op kers-agar, havermout-agar, gesteriliseerden aardappel, peen en suikerbiet. Op al deze voedingsbodems ging de eigenschap der pycnide-vorming verloren. Ten slotte werden proeven genomen met zoogenaamde „rolcultures" gekenmerkt door een zeer dunne laag van een vast medium, die den binnenkant van een cultuurbuis bekleedt. In deze culturen vormt *Phoma betae* FRANK binnen drie weken pycniden en zij blijft deze eigenschap doorloopend behouden, mits de overentingen geschieden met sporen en niet met mycelium. Als substraat vonden zij verschillende agarhoudende aftreksels geschikt, het beste voldeed volgens hen agarhoudend boonenextract. Het viel hun op, dat de pycniden bijna steeds ontstonden op de grenslijn der mycelium-takken, die van twee zijden van de entplaats in de cultuurbuis naar elkaar toe groeiden. Daar zij niet met éénspore-cultures werkten, wisten ze niet of de pycniden uit de vereeniging van myceliumdraden van verschillende sporen afkomstig waren, dan wel of andere omstandigheden een rol speelden. Met *Phoma oleracea* SACC, en *Phoma apiicola* KLEBAHN werden niet zulke omvangrijke proeven genomen als met *Phoma betae* FRANK; het is echter gelukt van gedegenereerde („zurückgegangene") cultures het vermogen tot pycniden-vorming terug te winnen door ze te kweeken in „rolcultures". Alleen met *Phoma apiicola* KLEBAHN gelukte dat niet. Zij vonden, dat *Phoma betae* ook nog op een andere manier de verloren eigenschap kon herwinnen. Een suikerbiet werd geïnfecteerd met gedegenereerd mycelium; in de biet zelf ontstonden geen pycniden, de groei der zwam was zeer matig. Na overenting van het uit de biet geïsoleerde mycelium op een voedingsbodem, werden nu spoedig daarop zeer veel pycniden gevormd. Uit deze

onderzoekingen van WESTERDIJK en VAN LUIJK volgt, dat de parasitaire *Phoma*-soorten (behalve *Ph. apiicola*) de eigenschap om pycniden te vormen behouden en ook terugkrijgen in rolcultures, terwijl deze eigenschap in de gewone plaatcultures spoedig verloren gaat. *Phoma betae* kan dit vermogen ook weer herwinnen door groei in de waardplant.

BURKHOLDER vraagt zich af of in het verloren gaan van infectievermogen tengevolge van het ontberen der waardplant een verklaring te vinden is voor het dikwijls waargenomen feit, dat bepaalde ziekten door vruchtwisseling tegengegaan worden, terwijl deze zelfde ziekten in hevigheid toenemen, wanneer voortdurend hetzelfde gewas verbouwd wordt. Over het algemeen neemt men thans aan, dat de vruchtwisseling bepaalde ziektekiemen zal doen uitsterven bij gebrek aan geschikte waardplanten. Men heeft echter geconstateerd, dat vele zwammen saprophytisch op grond kunnen leven gedurende een reeks van jaren, zoodat het zeer de vraag is of afwezigheid der waardplant den parasiet wel zal doen afsterven.

Het is meer dan eens gebleken, dat parasitische zwammen door groei op bepaalde voedingsbodems meer het karakter van saprophyten aannamen, terwijl, omgekeerd, zwammen met een meer saprophytisch karakter door herhaalde enting in planten sterkere parasitische neigingen verkregen. KILLIAN (1926) noemt hiervan enkele voorbeelden en wel de volgende:

KISSLING (1889) vond, dat de virulentie van *Botrytis cinerea* PERS. toeneemt wanneer de zwam gedurende eenige generaties in planten geënt wordt.

BEAUVERIE (1900) heeft verschillende rassen van *Botrytis cinerea* geïsoleerd, die meer of minder parasitair waren. Het gelukte hem de meer tot saprophytisme neigende rassen tot een krachtiger parasitisme te brengen door ze te kweeken in een vochtige atmosfeer bij een temperatuur van 30 ° tot 37 ° C.; terwijl het infectievermogen toeneemt, vermindert de conidiën-vorming.

SMITH (1901) werkte ook met parasitische en saprophytische rassen van *Botrytis cinerea*. Hij vond echter in tegenstelling met BEAUVERIE ,dat deze constant waren.

Botrytis parasitica CAVARA tast tulpen aan, door cultuur op kunstmatige voedingsbodem, doch kan, volgens een onderzoek van KLEBAHN een meer geprononceerd saprophytisch karakter krijgen.

LA RUE (1925) tracht een verklaring te vinden voor het verschijnsel van de veranderlijkheid der virulentie van sommige parasieten, die saprophytisch moeten leven. Het meest waarschijnlijk lijkt hem, dat de parasitische schimmels onder die omstandigheden saprophytische „mutanten" afsplitsen, die den parasiet overwoe-

keren en ten slotte alleen overblijven. Een dergelijke tot saprophiet geworden zwam zou haar infectievermogen terug kunnen krijgen, wanneer zij met haar waardplant in aanraking komt; dan zou een eventueel ontstane parasitiesche „mutant" weer de gelegenheid hebben den saprophytischen vorm te overwoekeren. La Rue heeft zijn veronderstelling niet aan experimenten getoetst.

2. *Onderzoek betreffende de degeneratie van den macro-vorm van Phoma apiicola.*

Gedurende het eerste jaar, waarin ik mijn onderzoekingen over *Phoma apiicola* verrichtte, bemerkte ik, dat de kolonie van den macro-vorm, wanneer hij pas van de plant geïsoleerd en op een voedingsbodem overgebracht is, een grijsgroene kleur heeft en als een dikke vlok op 't substraat ligt. Kweekt men echter de zwam gedurende eenige maanden door myceliumoverenting voort op steriele voedingsbodems, dan gaat de kleur langzamerhand tot wit over. Naast het verlies van kleur treden ook nog andere verschijnselen op, die niet altijd hetzelfde zijn; meestal wordt de kolonie minder dik, doch zij breidt zich over een grootere oppervlakte van den agar uit. In een dergelijken gedegenereerden toestand reageert de macro-vorm niet meer met den micro-vorm. De groei wordt thans gestuit in de zône waar de ontmoeting plaats moest hebben; de twee kolonies, die vroeger met elkaar samenwerkten, stooten thans elkaar af.

Dit bracht mij ertoe bij *Phoma apiicola* Klebahn een onderzoek in te stellen naar den invloed eener saprophytische levenswijze op de pycnide-vorming. Ik vergeleek tot dit doel een Venloschen macro-vorm, die acht maanden door myceliumoverenting op agar-voedingsbodems voortgekweekt was, met een kolonie afkomstig van dezelfde éénspore-cultuur doch die twee maanden geleden opnieuw uit sporen geïsoleerd was van een plant, welke met deze zwam kunstmatig was geïnfecteerd. De cultures entte ik ieder in een zevental buizen, waarin een rolletje filtreerpapier stond, gedrenkt in aftreksel van afgestorven selderijbladeren. Na een veertiental dagen was er tusschen die twee cultures een in het oog loopend verschil te zien. De in het laboratorium bewaarde zwam had een grijsachtig wit mycelium gevormd. Dit was niet vlokkig, doch samengevallen op het substraat. De cultuur, die kort geleden in een plant geleefd had, had zich flink ontwikkeld tot een dikke, wollige kolonie, de kleur was grijsgroen. Na een maand trad een nog duidelijker verschil aan 't licht. De van de plant opnieuw geïsoleerde cultuur

was toen in alle buizen rijk aan pycniden, terwijl de bewaarde cultuur in geen der buizen pycniden gevormd had, zelfs niet na twee maanden.

Uit deze proef blijkt, dat de macro-vorm de eigenschap van pycnide-vorming door een langdurigen groei op minder gunstige voedingsbodems kan verliezen en dat deze eigenschap door verblijf in de waardplant weer teruggewonnen kan worden.

Het was mij opgevallen, dat kolonies van den macro-vorm, die ontstaan waren uit sporen der conjunctpycniden een dikker en meer wollig uiterlijk hebben dan de kolonies, die door myceliumoverenting langen tijd voortgekweekt waren. Ik kwam daardoor op de gedachte te onderzoeken of de vorming dezer pycniden wellicht een dergelijken gunstigen invloed zou hebben op den macro-vorm als passage door de waardplant.

Om dit na te gaan vergeleek ik twee cultures van den Maastrichtschen macro-vorm, die beide van eenzelfde éénspore cultuur afkomstig waren; de eene cultuur (aangeduid met Ms. 1) was gedurende 10 maanden alleen door overenting van mycelium vermeerderd; de andere was 2 à 3 maanden geleden opnieuw geïsoleerd uit een pycnospore eener conjunctpycnide, ontstaan uit de bovengenoemde Ms. 1 cultuur en een kolonie van den Maastrichtschen micro-vorm. De nieuwe cultuur is aangeduid met Ms. 1 (7—8). Deze twee cultures werden ieder geënt in zeven cultuurbuizen op filtreerpapier, gedrenkt in bladaftreksel; daarnaast ook ieder in 7 buizen met gesteriliseerde selderijbladstelen. Beide partijen werden in 't donker geplaatst. Na eenigen tijd bleek, dat er tusschen den groei der twee cultures op bladaftreksel geen verschil te zien was, de kleur van het mycelium van beide partijen was wit en in geen der beide partijen trad pycnide-vorming op.

In de buizen met selderijbladstelen was er echter wel degelijk een groot verschil te zien; de oorspronkelijke cultuur der Ms. 1 had daarop geen pycniden gevormd, de Ms. 1 (7—8) echter betrekkelijk veel. Uit dit laatste blijkt, dat ook tengevolge van de vorming eener conjunctpycnide regeneratie optreedt. Voor het feit, dat dit in de cultures op bladaftreksel niet tot uiting komt, zijn twee verklaringen mogelijk; òf conjunctpycnide-vorming heeft een minder sterk regenereerend vermogen dan passage door de waardplant, òf wel de regeneratie is weer gedeeltelijk verloren gegaan door den groei als mycelium op voedingsagar gedurende 2 à 3 maanden.

Om deze waarnemingen nog eens nader te controleeren en uit te breiden, werd een proef op een eenigszins grootere schaal genomen.

In het voorgaande zijn vier voedingsbodems genoemd, waarop de macro-vorm pycniden doet ontstaan, doch zij zijn niet alle even bevorderlijk voor dit proces. Een macro-vorm, die eenigen tijd op een agarvoedingsbodem gegroeid is, kan b.v. op COONS' oplossing nog pycniden vormen, terwijl hij dat niet meer doet op bladaftreksel. Verder maakte ik gebruik van de omstandigheid, dat in mijn bezit waren drie subcultures der Ms. 1, die op verschillende na elkaar gelegen tijden met den Maastrichtschen micro-vorm conjunctpycniden gevormd hadden. Dit was op de volgende wijze gebeurd.

De Ms. 1, die ik bij het begin van dit onderzoek als macro-vorm geïsoleerd had, was gedurende 7 of 8 maanden uitsluitend door myceliumoverenting op agarvoedingsbodems voortgekweekt. Deze cultuur vormde toen met den Maastrichtschen micro-vorm een conjunctpycnide. Uit de pycnosporen werd de macro-vorm opnieuw geïsoleerd en aangeduid met Ms. 1 (7—8); 2 of 3 maanden daarna vormde deze cultuur opnieuw conjunctpycniden, waaruit de cultuur Ms. 1 (10) werd geïsoleerd. Twee maanden later werd op dezelfde manier de Ms. 1 (12) geïsoleerd. Deze 4 cultures werden nu uitgezet in een aantal petrischalen met selderij-agar. Om zooveel mogelijk gelijkwaardig mycelium te hebben, gebruikte ik voor de hieronder te beschrijven proef myceliumstukjes, die even ver van de entplaats verwijderd waren, dus van den omtrek van de ronde kolonies. Om voldoende entmateriaal te hebben, moest ik de kolonies vrij groot laten worden, waarvoor zij ongeveer een maand op dezen voedingsbodem moesten groeien. De groei had plaats bij 20° C.

Na die maand was er een duidelijk verschil in habitus te zien. De Ms. 1 vertoonde een uitgestrekte vlakke kolonie, die de geheele oppervlakte der petrischaal bedekte; er was niet veel vlokkig luchtmycelium aanwezig; de kleur der kolonie was vuilwit; er waren geen pycniden gevormd. De kolonie der Ms. 1 (12) was kleiner dan de vorige, de groei was meer compact en er was veel wollig luchtmycelium aanwezig; de kleur was grijs; er waren ook hier geen pycniden gevormd. De kolonies der twee overige cultures vertoonden min of meer duidelijke overgangen tusschen deze twee uitersten.

Deze vier cultures werden geënt op vier verschillende voedingsbodems: COONS' oplossing, selderij-bladsteel, blad-aftreksel en knolselderij. Van iederen voedingsbodem waren telkens zes cultuurbuizen aanwezig. Het aantal der op deze voedingsbodems gevormde pycniden werd op bepaalde tijden geschat. Het cijfer 6 werd gegeven, wanneer er zeer veel pycniden aanwezig waren, het cijfer 1, wanneer er maar enkele aanwezig waren; de daartus-

schen liggende cijfers dienden voor de verschillende overgangen. De cultuurbuizen werden afzonderlijk beoordeeld. In tabel II beteekent dus 2 × 6, 3 × 5, 1 × 0, dat er in twee buizen zeer veel, in drie veel en in één geen pycniden aanwezig waren.

Deze geheele partij cultuurbuizen werd onder zooveel mogelijk gelijke omstandigheden gehouden bij een temperatuur, die wisselde van 17° tot 20° C. De belichting zal misschien niet voor alle buizen precies dezelfde geweest zijn, het is mogelijk dat de eene iets minder in het licht gestaan heeft dan de andere.

Door nevenstaande tabel werd de uitslag der vroegere proef bevestigd. Er blijkt duidelijk uit, dat de macro-vorm door een langdurigen groei op voedingsagar de eigenschap verliest om op een bepaald medium pycniden te vormen. Deze degeneratie komt spoediger tot uiting op den eenen dan op den anderen voedingsbodem. Tevens volgt er uit, dat de verloren gegane eigenschap weer teruggewonnen kan worden door den macro-vorm opnieuw te isoleeren uit een spore van een conjunctpycnide. Dit is echter niet altijd door te voeren, daar al te ver gedegenereerd mycelium geen conjunctpycniden meer vormt met zijn partner.

Beschouwt men in de tabel de cijfers van cultuur Ms. 1(12) op Coons' oplossing, dan valt het op, dat in drie der buizen langzamer pycniden gevormd werden, dan eigenlijk het geval zou moeten zijn. Dit kan niet liggen aan een niet juiste samenstelling van den voedingsbodem of aan ongunstige omstandigheden; op dit laatste lette ik na de eerste 14 dagen nauwkeurig. Wat er de oorzaak van geweest is, heb ik niet kunnen ontdekken.

Uit dit onderzoek kan het volgende worden geconcludeerd: Degeneratie van den macro-vorm, welke zich uit in abnormale myceliumgroei en in het verlies van het vermogen tot pycnidevorming, kon worden voorkomen door de zwam voort te kweeken uit pycnosporen, hetzij dat deze zich hebben gevormd op de levende plant, hetzij dat zij op doode substraten in conjunctpycniden zijn ontstaan. Dat degeneratie zich ook kan uiten in verlies van pathogene eigenschappen werd reeds bij de beschrijving der infectieproeven in het eerste deel vermeld.

TABEL II. PYCNIDE-VORMING DER CULTUUR MS 1 EN DRIE HARER SUBCULTURES, DIE NIET, ZOOALS DE MS. 1, ALLEEN DOOR MYCELIUMOVERENTING DOCH OP DRIE VERSCHILLENDE NA ELKAAR GELEGEN TIJDSTIPPEN ALS SPOREN UIT EEN CONJUNCTPYCNIDE GEÏSOLEERD WAREN.

	Aantal dagen na enting:												Aantal dagen na enting:											
	Ms 1						Ms 1 (7-8)						M s 1 (10)						M s 1 (12)					
Voedingsbodems	14	21	28	35	56	77	14	21	28	35	56	77	14	21	28	35	56	77	14	21	28	35	56	77
Coons' oplossing	6×0	2×2 4×0	3×2 3×0	3×2 3×0	3×3 2×1 1×0	3×5 2×4 1×0	1×1 5×0	2×4 3×2 1×0	2×4 3×2 1×0	1×5 2×4 3×2	1×5 3×4 2×3	3×5 3×4	6×6	6×6	6×6	6×6	6×6	6×6	3×6 3×0	3×6 3×0	3×6 3×0	3×6 1×3 2×0	4×6 2×0	4×6 2×5
Selderij-stengel	6×0	6×0	2×1 4×0	2×1 4×0	2×2 1×1 3×0	1×4 1×3 1×2 3×0	1×1 5×0	1×6 1×4 4×0	1×5 2×4 3×0	2×5 1×4 3×0	2×5 1×4 3×0	2×5 1×4 3×0	3×1 3×0	2×5 3×3 1×0	5×5 1×0	5×5 1×0	5×5 1×0	2×6 3×5 1×0	3×5 2×1 1×0	3×6 2×5 1×0	5×6 1×2	5×6 1×2	5×6 1×2	5×6 1×2
Selderij-bladaftreksel	6×0	6×0	6×0	6×0	6×0	6×0	6×0	3×1 3×0	3×2 3×0	3×2 3×0	3×3 3×0	4×3 2×1	6×0	3×1 3×0	3×2 3×0	3×2 3×0	3×2 3×0	3×4 2×1 1×0	6×0	6×1	6×2	6×2	6×4	6×4
Selderij-knol.....	6×0	6×0	6×0	6×0	1×1 5×0	1×4 1×3 4×1	6×0	6×0	6×0	1×1 5×0	1×3 1×2 4×0	2×4 1×3 3×1	6×0	6×0	6×0	1×1 5×0	2×2 4×0	1×3 3×2 2×0	6×0	2×1 4×0	2×1 4×0	2×1 4×0	5×3 1×0	1×4 4×3 1×0

	M s 1						Ms. 1 (7-8)						M s 1 (10)						M s 1 (12)					
Voedingsbodems	14	21	28	35	56	77	14	21	28	35	56	77	14	21	28	35	56	77	14	21	28	35	56	77
Coons' oplossing		4	6	6	11	23	1	14	14	19	23	27	36	36	36	36	36	36	18	18	18	21	24	34
Selderij-stengel			2	2	4	9	1	10	13	14	14	14	3	19	25	25	25	27	17	28	32	32	32	32
Selderij-bladaftreksel								3	6	6	9	14		3	6	6	6	14		6	12	12	24	24
Selderij-knol					1	11				1	5	14				1	4	9		2	2	2	15	16

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON THE „ROOT-ROT" OF TURNIP-ROOTED CELERY (CELERIAC) CAUSED BY PHOMA APIICOLA KLEBAHN, AND ON LOCAL STRAINS AND SYNERGETIC FORMS OF THIS FUNGUS.

1. *Phoma apiicola* KLEBAHN causes much injury to turnip-rooted celery (celeriac) plants in Holland.
2. A second species of Phoma was isolated from celeriac seed. It resembles *Phoma apiicola* KLEBAHN, except in the size of its spores and in its non-pathogenicity. The spores of this as yet undetermined species are larger and it does not cause infection of the plant.
3. Many samples of seed were examined, but once only on a seed a pycnidium of *Phoma apiicola* KLEBAHN was found. It is expected that, though extremely rare, the pathogene may be present on seed.
4. Two strains of *Phoma apiicola* were obtained; one from celeriac roots and the basal parts of the petioles of plants growing on sandy soil, rich in organic substances, near Venlo; the other from roots and the basal parts of petioles of plants growing on clay soil near Maastricht.
5. Both strains, when cultivated directly from the plants, grew well on filterpaper in COONS' nutritive solution.
6. Mycelial cultures from both these strains produced pycnidia on sterilized celeriac roots and sterilized crushed petioles of celeriac plants.
7. When pycnospores of these two strains were transferred from sterilised celeriac roots to COONS' liquid medium, the Maastricht strain grew well, whereas the Venlo strain did not show any development.
8. When spores from the pycnidia formed on sterilized celeriac roots were sown on agar media two types of individuals were obtained: one resembling the original form with much mycelial growth, the other producing abundant pycnidia.
9. The pycnidia of the new form were smaller in size, and the name *Phoma apiicola* KLEBAHN *micro-forma* is applied to it to distinguish it from the usual form which is now called *Phoma apiicola* KLEBAHN *macro-forma.*
10. Both of the strains, from Venlo and Maastricht respectively, produced the two different forms. The micro- and the macro-form of the Venlo strain did not grow on filter paper in the liquid medium of COONS; the two Maastricht forms grew well on it.
11. On COONS' solution solidified by agar the two forms of both strains grew fairly well. On this medium a difference in cultural habit and colour, between the macro-form of Venlo and that of Maastricht was observed, and also between the micro-form of Venlo and that of Maastricht (Plate XVIII, fig. 6 a. 7).
12. When the micro-form is transferred at room-temperature to sterilized

petioles pycnidia are formed soon; when pycnospores obtained from them were grown on agar media the micro-form was reproduced only, thus proving it to be constant under these circumstances. On keeping the cultures between 0—5° C., however, pycnidial formation was slow. Spores from the pycnidia formed between these temperatures, when transferred to agar media produced individuals of both forms; hence the micro-form under these conditions had reverted partially to the macro-form.

13. The micro- and macro-form when grown together produce abundant pycnidia at the line of contact of their mycelia. These pycnidia are twice as large as those of the micro-form, though they do not differ much in size from those of the macro-form. They are here called „conjunctpycnidia". (Plate XVII, fig. 4 a. 5.)
14. Conjunctpycnidia contain spores of both the micro- and macro-form; but the spores of the latter are more numerous than those of the former.
15. Both of the local strains and the micro- and macro-forms of them are able to attack the roots and the basal parts of the petioles of celeriac.
16. The Venlo micro- and macro-forms formed conjunctpycnidia with the Maastricht macro- and micro-forms. On sowing spores from such conjunctpycnidia, the respective forms used, were segregated retaining their cultural characteristics. No possibility of sexuality was seen in the formation of these conjunctpycnidia and the term „heterothallic" forms was therefore avoided. These forms are called „synergetic" and the conjunctpycnidia are considered to be chimeras.
17. Under ordinary conditions both of the strains and their two forms do not attack the laminae of the leaves; but under humid conditions the micro-forms attack them severely, wilst the macro-forms scarcely attack them at all. (Plate XVIII, fig. 8.)
18. Of the twenty varieties of celeriac tested two showed greater resistance under greenhouse conditions, and also under field conditions. The two varieties are larger and grow rapidly.
19. The macro-form loses its virulence and power of pycnidial formation if continuously grown from mycelium on agar media; also the mode of growth and the colour of the mycelium is altered.
20. If, however it is cultivated occasionally on the living plant or with the micro-form and recultivated from the spores of the resulting conjunctpycnidia, it does not degenerate.

LITERATUUR-LIJST.

Appel, O. u. Wollenweber, H. W., 1913. Grundlagen einer Monographie der Gattung Fusarium Link. Arb. Kais. Biol. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft. Band VIII, p. 1.

Atanasoff, D., 1920. Fusarium-blight of wheat and other cereals. Jour. agr. res., Vol. XX, p. 88.

Baccarini, P., 1890. Sullo suiluppo dei pycnidii. Nuovo Gior. Bot. Ital., Vol. 22, p. 150.

Bary, A. de, 1884. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Myzetozoën und Bacteriën. Leipzig.

Bauke, H., 1876. Beiträge zur Kenntnis der Pycniden, I. Nova Acta K sl. Leop.-Carol. Deutsch. Akad. Naturforscher. Band XXXVIII. Nr. 5.

Baur, E., 1919. Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. 4. Aufl. Berlin.

Bennett, C. W., 1921. A Phoma rootrot of celery. Michigan, Agr. Exp. Sta., Tech. Bul. 53.

Bensaude, M., 1918. Recherches sur le cycle évolutif et la sexualité chez les Basidiomycetes. Nemours.

Betts, E., 1926. Heterothallism of Ascobolus carbonarius. Am. Jour. Bot., Vol. XIII, p. 427.

Blaauw, A. H., 1919. Beginsel en stof tot onderzoek. Med. Landbouwhoogeschool, Wageningen, Deel XV, p. 205.

Blakeslee, Q. F., 1920. Sexuality in Mucors. Science. N. S. Vol. L I, p. 375, 403.

Brefeld, O., 1891. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie, Heft X, p. 216.

Brunswick, H., 1924. Neuere Untersuchungen über die Sexualitätverhältnisse bei den Pilzen. Zeitschr. ind. Abst. u. Vererb. Band XXXIV, p. 214.

Burgeff, H., 1914—1925. Untersuchungen über die Variabilität, Sexualität und Erblichkeit von Phycomyces. Flora, N. F. 7, p. 259; 8, p. 1.

Burger, O. F., 1919. Sexuality in Cunninghamella. Bot. Gaz., Vol. 68, p. 134.

Burkholder, H., 1925. Variations in a member of the genus Fusarium, grown in culture for a period of five years. Am. Jour. Bot., Vol. XII, p. 245.

Coons, C. H., 1916. Factors involved in the growth and pycnidiumformation of Plenodomus fuscomaculans. Jour. agr. res., Vol. 5, p. 752.

————, 1917. A Phoma disease of celery. An. Rpt., Michigan Sta. Board Agr., 30, p. 318.

Craigie, J. G., 1927. Discovery of the function of the pycnidia of the rust fungi. Nature, 120, p. 765.

Dodge, D. O., 1920. Life history of Ascobolus magnificus. Mycologia, Vol. 12, p. 115.
Dodge, B. O., 1923. Origin of the central and ostiolar cavities in pycnidia of certain fungous parasites. Jour. Agr. Res., Vol. 23, p. 743.
Dorogin, G., 1923. Instruktsia dlja proïzwodstwa ispytainia semjan na prisoetstwië gribnyck wrediteley. Petrogradskaja Stantsya Zastschity Rastenij of wretiley.
Edgerton, C. W., 1914. Plus and minus strains in the genus Glomerella. Am. Jour. Bot., Vol. I, p. 244.
Edson, M. A., 1915. Histological relations of sugar-beet seedlings and Phoma betae. Jour. Agr. Res., Vol. V, p. 55.
Gäumann, E., 1926. Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena.
Halsted, B. D., 1891. The celery-leafspot. Ann. Rpt. New Yersey. Agr. Exp. Sta., 12, p. 253.
Hanna, W. F., 1925. The problem of sex in Coprinus lagopus. An. Bot. Vol. 39, p. 431.
Hedgcock, G. G. ,1904. Proof of the identity of Phoma and Phyllosticta on the sugarbeet. Jour. Myc., Vol. 10.
Hesler, L. R., 1915. Blackrot leafspot and canker of Pomatious fruit. Cornell Agr. Exp. Sta., Bul. 379, p. 51.
Hollrung, 1903. Trockene Bakteriosen. Jahresbericht des Sonderausschusses f. Pflanzenschutz., p. 130. Arb. D. L. G., Heft 94.
Jauchen, 1909. Der Gemüsebau in der Umgegend von Zerbst. Jahrb. d. D. L. G., Band 24, p. 454.
Kellermann, A. A. M., 1903. Trockene Bakteriosen. Jahresbericht d. Sonderausschusses f. Pflanzenschutz, p. 129. Arb. D. L. G., Heft 94.
Kempton, F. E., 1919, Origin and development of the pycnidium. Bot. Gaz., Vol. LXVIII, p. 233.
Killian, M. Ch., 1926. Variations des charactères morphologiques et biologiques chez les Ascomycètes et les Deuteromycètes parasites. Rev. Path. Vég. Tome 13, p. 134.
Klebahn, H., 1910. Krankheiten des Selleries. Zeitschr. f. Pfl. Krankh., Bd. XX, p. 1.
————, 1918. Haupt- und Nebenfruchtformen der Ascomyceten, I. Teil, p. 33 en 34. Leipzig.
————, 1921. Der Pilz der Tomatenstengelkrankheit und seine Schlauchfruchtform. Zeitschr. f. Pfl. Krankh., Bd. XXXI, p. 1.
Kniep, H., 1919. Über morphologische und physiologische Geschlechtsdifferenzierung. Verh. Phys. Mediz. Gesellsch. Würzburg. N. F., Band 46, p. 1.
Larue, C. D., 1925. Loss of virulence in fungi. Science. N. S., Vol. LXII. p. 205.
Massey, L. M., 1928. Dry rot of Gladiolus corms. Phytopathology, Vol. 18, p. 525.
McCormick, Fl. A., 1926. Perithecia of Thielavia basicola Zopf in culture and the stimulation of their production by extracts from other fungi. Rev. Appl. Myc., Vol. V, p. 392.
Mercer, W. B., 1913. On the morphology and development of Phoma Richardiae n. sp. Myc. Centralbl., Bd. II, p. 244.
Mounce, I., 1921. Homothallism and the production of fruitbodies by monosporous mycelia in the genus Coprinus. Trans. Brit. Myc. Soc., Vol. 7, p. 198.
Muller, H. R. A., 1925. Een onderzoek naar den invloed van eenige ontsmettingsmiddelen op de kiemkracht van tomaten- en selderijzaad.

Landbouwhoogeschool, Wageningen, Lab. v. Tuinbouwplantenteelt, No. 2.

PETHYBRIDGE, G. H., 1916. The Verticillium disease of the potato. Scient. Proc. Roy. Dublin Soc., Vol. XV, p. 79.

————, 1926. Root rot. Ministr. Agr. and Fisheries. Misc. Publ., No. 52, p. 47.

PRATT, CL. A., 1924. The staling of fungal cultures, I. An. Bot. Vol. XXXVIII, p. 570.

QUANJER, H. M. en SLAGTER, N., 1914. De roest of schurftziekte van de selderijknol en enkele opmerkingen over andere selderieziekten. Tijdschr. o. Plantenziekten, Jaarg. 20, p. 13.

RITZEMA BOS, J., 1904. Bakteriënziekten van Knolselderij. Tijdschr. o. Plantenziekten, Jaarg. 10, p. 15.

REDDICK,D., 1911. The blackrot disease of grapes. Cornell. Agr. Exp. Sta., Bul. 293, p. 289.

SHEAR, C. D. and WOOD, A. K., 1913. Studies of fungous parasites belonging to the genus Glomerella. U. S. Dept. Agr. Bur. Plant Indus. Bul. 252, p. 74.

SCHEGG, H., 1915. Zur Entwicklungsgeschichte und Biologie der Pycniden, der Schlingenmycelien und Hyphenknäuel. Centralbl. f. Bakt., II, Bd. 43, p. 326, 339.

STAKMAN, E. C. and CHRISTENSEN, J. J., 1927. Heterothallism in Ustilago zeae. Phytopathology, Vol. 17, p. 827.

STEGLICH, 1898—1900. Sellerierost. Bakteriose. Bakteriosen. Jahresbericht d. Sonderausschusses f. Pflanzenschutz. Arb. d. D. L. G., Heft 38, p. 103. H. 50, p. 136, H. 60, p. 161.

STRASBURGER, E., 1909. Meine Stellungnahme zur Frage der Pfropfbastarde. Ber. d. dtsch. bot. Ges., Bd. 27, p. 520.

TAVEL, F. VON, 1886. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Pyrenomyceten. Bot. Zeit., Bd. 44, p. 825.

TEMPEL, W., 1926. Die Schorfkrankheit der Sellerieknollen. Die kranke Pflanze, Bd. III, p. 188.

VANDENDRIES, R., 1923. Recherches sur le déterminisme sexuel des Basidiomycètes. Bruxelles.

VAN HOOK, J. M., 1907. Celery rootrot. Ohio Agr. Exp. Sta., Circ. 72.

WESTERDIJK, J. und VAN LUYK, A., 1920. Die Künstliche Kultur von Phoma-Arten., Meded. uit het Phytopath. Lab. W. C. Scholten, IV, p. 26.

WILSON, E. E., 1927. Effect of fungous extracts upon the initiation and growth of the perithecia of Venturia inaequalis (Cke) Wint., in pure culture. Phytopathology, Vol. 17, p. 835.

ZOPF, W., 1890. Die Pilze. Breslau, p. 54.

VERKLARING DER FIGUREN.

Plaat XVI.

Fig. 1 en 2. Een sterk aangetaste knol; de fijnere wortels zijn zoo goed als verdwenen; de geheele knol heeft een schurftig uiterlijk. De bladschijven zijn echter volkomen gezond gebleven, zooals te zien is in fig. 1; alleen de oudste bladstelen zijn aan den voet aangetast en dientengevolge omgevallen. Fig. 2 stelt dezelfde knol sterker vergroot voor, nadat de gezonde bladeren zijn weggenomen.

Plaat XVII.

Fig. 3. De linksche buis is de cultuur van een macro-vorm, de rechtsche die van een micro-vorm. De voedingsbodem bestaat uit een tegen den wand der buis platgedrukte gesteriliseerde selderij-bladsteel.

Fig. 4. Links een kolonie van een micro-vorm, rechts een kolonie van een macro-vorm, daartusschen in ziet men duidelijk de conjunctpycniden optreden.

Fig. 5. Een petrischaal, waarin sporen uitgezaaid zijn, afkomstig uit één conjunctpycnide. Men ziet, dat de kolonies van den micro- en den macro-vorm beide aanwezig zijn, terwijl op de plaatsen, waar de mycelia van den macro- en micro-vorm elkaar ontmoeten, weer conjunctpycniden optreden. Voedingsbodem: selderij-agar.

Plaat XVIII.

Fig. 6 en 7. In de linksche petrischaal zijn kolonies van den Venloschen micro- en macro-vorm uitgezet, in de rechtsche petrischaal kolonies van de beide Maastrichtsche vormen. Voedingsbodem: Coons' voedingsoplossing + 1½ % agar.
Photo 6 is genomen bij doorvallend licht, photo 7 bij opvallend licht.

Fig. 8. De planten in de potten, aangeduid door A zijn bespoten met een sporen-suspensie van den macro-vorm; die welke aangeduid zijn door C, met een sporen-suspensie van den micro-vorm; terwijl de planten in de potten aangeduid door B bespoten zijn met steriel water. Over de planten gemerkt met 1 werd (na bespuiting met sporen, resp. met steriel water) een glasklok geplaatst, over de planten gemerkt met 2 werd dat niet gedaan.
Het geheel stond in een infectie-kasje.

Onder de klok	bladinfectie	door den macro-v. in geringe mate. door den micro-v. in ernstige mate.
	knol- en stengelv. infectie	zoowel door den macro- als door den micro-vorm in zeer ernstige mate.
Buiten de klok	bladinfectie	noch door den macro- noch door den micro-vorm.
	knol en stengelv. infectie	zoowel door den macro- als door den micro-vorm.

De planten in de beide contrôle-potten bleven geheel gezond.

De foto's van de figuren 1 t.m. 7 zijn vervaardigd door J. Boekhorst, die van figuur 8 door J. van de Peppel.

Fig. 1

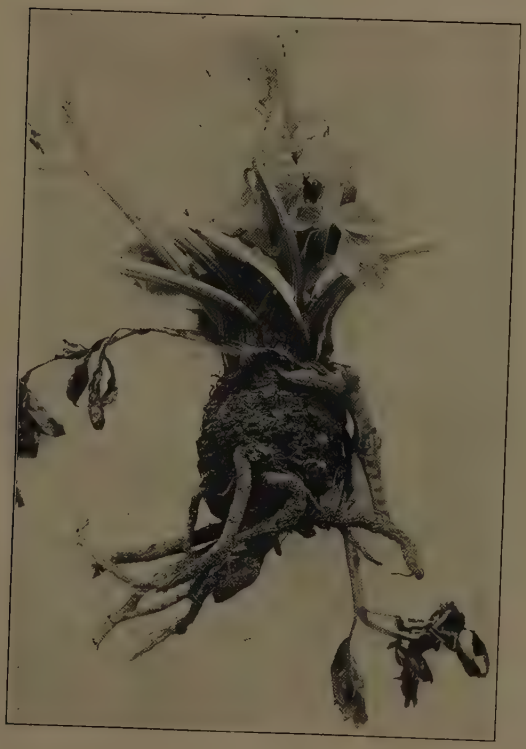


Fig. 2

Fig. 3

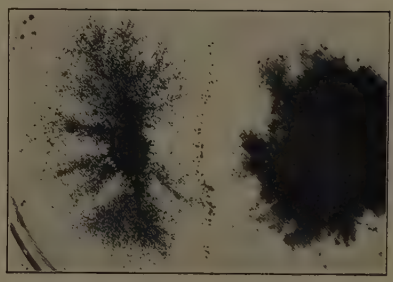


Fig. 4

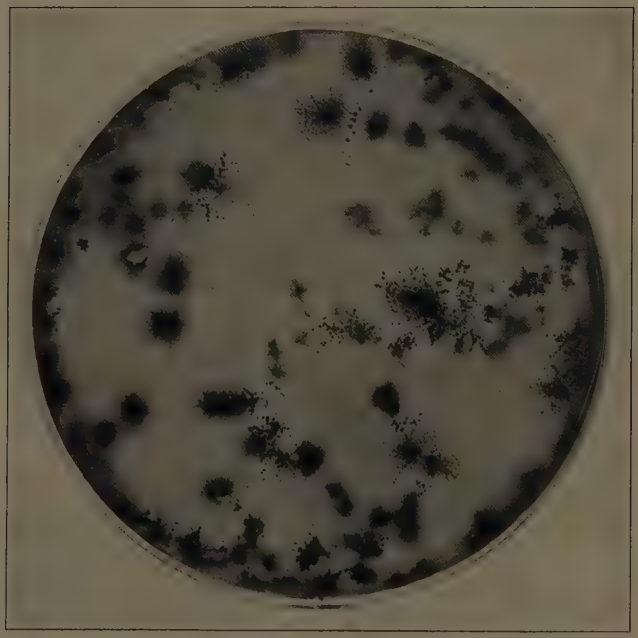


Fig. 5

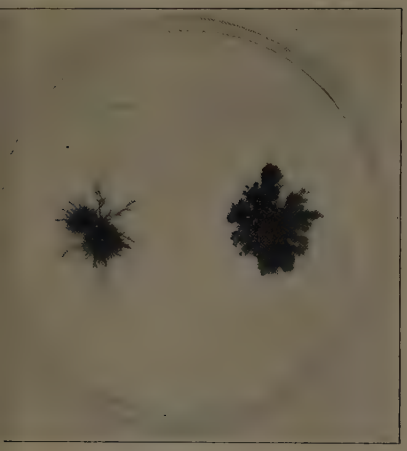


Fig. 6a

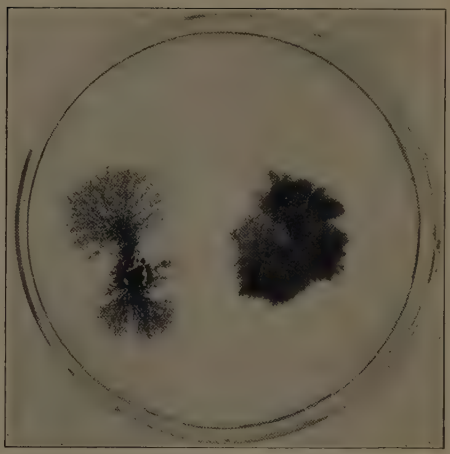


Fig. 6b

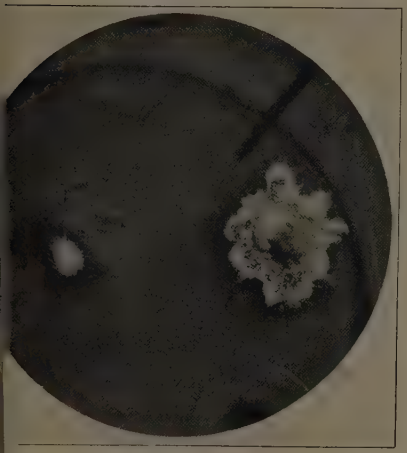


Fig. 7a

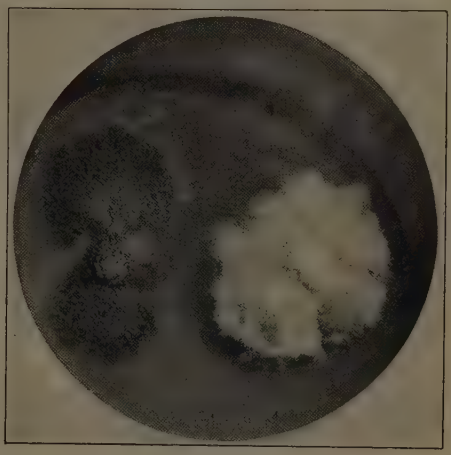


Fig. 7b

A$_2$ B$_1$ B$_2$ C$_1$ C$_2$

Fig. 8